

İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine

BIOMARKER OF INVIVO OXIDATIVE DNA DAMAGE; 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSINE

Beran YOKUŞ*, Dilek Ülker ÇAKIR**

* Arş.Gör., Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD,

** Arş.Gör., Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, DİYARBAKIR

Özet

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-Protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir. DNA'da oluşan bu oksidatif hasar, mutagenезisin, karsinogenезisin ve yaşlanmanın göstergesidir. Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bir bileşik olup serbest radikallerin etkilerine açıktır. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoxyguanosine, guanin'in 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, reaktif oksijen türlerinin, DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden biridir. GC=AT dönüşümüne neden olup premutajenik özellik göstererek mutasyonlara ve kanser gelişimine sebep olabilir. Bir çok hastalığın etiolojisinde 8-hidroksi-2'-deoxyguanosin'in önemi araştırılmış olmasına rağmen daha araştırılması gereken bir çok hastalık vardır. Ayrıca kanserojen maddelerin etkilerinin araştırılmasında ve günlük diyetle alınması gereken antioksidan miktarlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Oksidatif DNA hasarının önemini ve mekanizmasını anlayabilmek için doğru ve kesin ölçümlerin yapılması gereklidir. Bu amaçla, yüksek basınçlı likit kromatografisi, gaz kromatografisi ve immunokimyasal yöntemler gibi farklı analiz teknikleri kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,
Oksidatif DNA hasarı, Serbest radikaller

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:535-543

Summary

It is known that oxidative stress produces a number of lesions in DNA such as base lesions, sugar lesions, DNA-Protein cross-links, single-strand breaks, double-strand breaks and abasic sites by a variety of mechanisms. Oxidative DNA damage is implicated in mutagenesis, carcinogenesis and aging. Guanine has the lowest ionization potential in the consist of DNA for this reason it exposed of free radicals. The modified base 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is a sensitive marker of the DNA damage due to hydroxyl attack at the C8 of guanine. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is one of the 23 oxidative base adducts resulting from reactive oxygen species induced damage to DNA. It mainly induces GC-AT transversions and therefore may be responsible for mutagenesis and carcinogenesis by showing premutagenic property. Although several diseases have been investigated in relation to the ethiological importance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, further studies should be carried to investigate the role of oxidative DNA damage in disease status. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine can be utilized to determine amount of the antioxidants that are necessary to take on the daily diet and to investigate effect of cancerogen materials. To understand the importance and mechanism of DNA damage it is necessary to carry out accurate and precise measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. For this purpose, different analytical techniques such as high pressure liquid chromatography, gas chromatography and immunochemical methods have been used for its measurement.

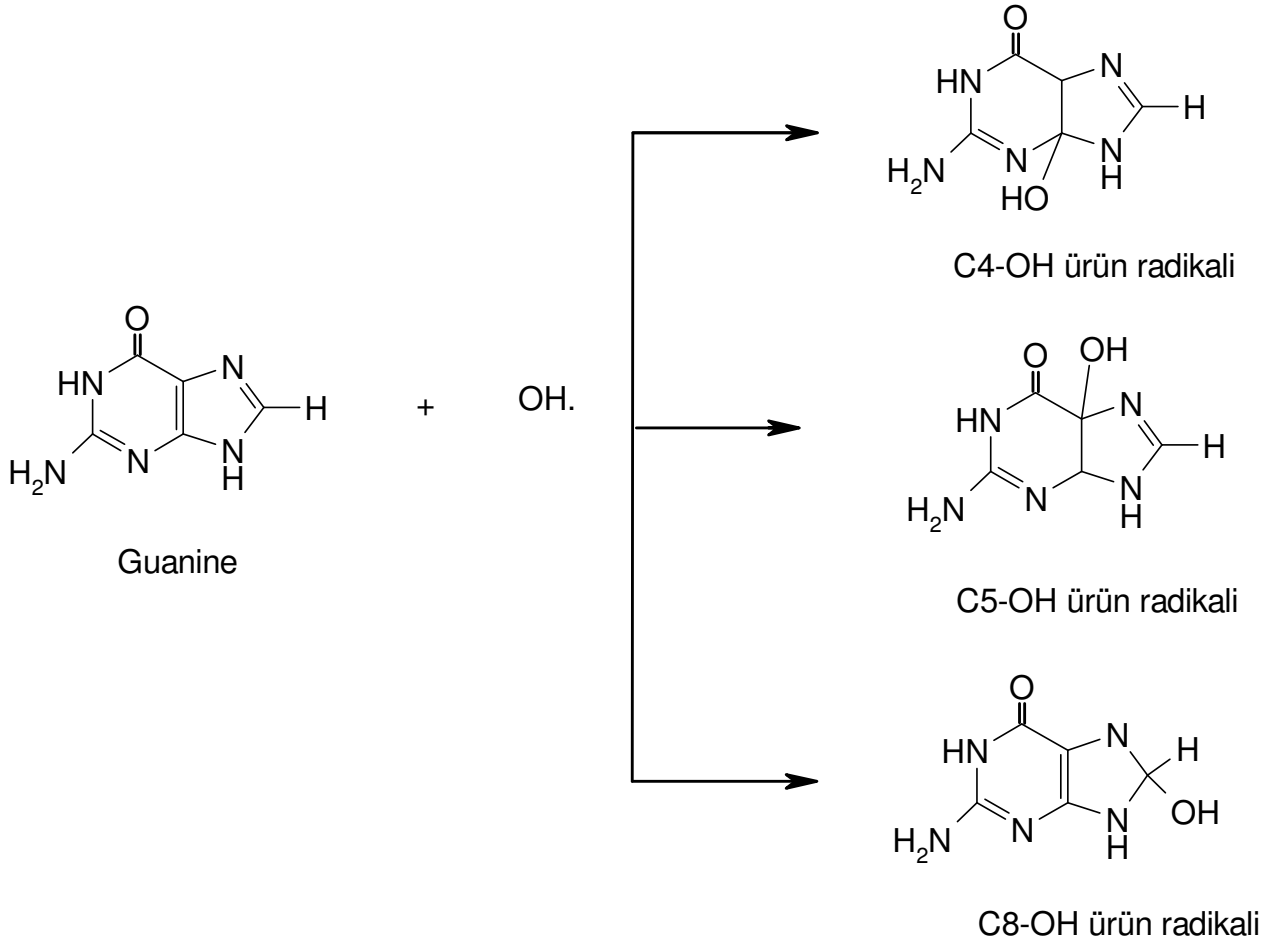
Key Words: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,
Oxidative DNA damage, Free radicals

T Klin J Med Sci 2002, 22:535-543

Oksidatif stresin; lipidler, proteinler ve DNA gibi biyolojik makromoleküller üzerinde değişiklikler oluşturarak, hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Reaktif Oksijen Türleri (ROS), DNA'da farklı mekanizmalar ile; baz ve şekerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara neden olur (1-6). DNA'da ROS tarafından oluşan oksidatif hasar, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların

başlıca nedeni ve göstergesi olarak görülmektedir. Hücre ve dokularda oksidatif hasara uğramış, bir çok purin ve pirimidin lezyonunun tespiti ve miktar analizi yapılmıştır.

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), ROS'un DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinenidir. Diğer DNA baz hasar ürünlerinin ise daha az mutajenik olmaları muhtemeldir (4,7-16). İlk defa 1984 yılında Kasai ve Nishimura tarafından, oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak tespit edilmiştir (22). Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon



Şekil.1. Hidroksil radikali ile guanin bazının reaksiyonu (2)

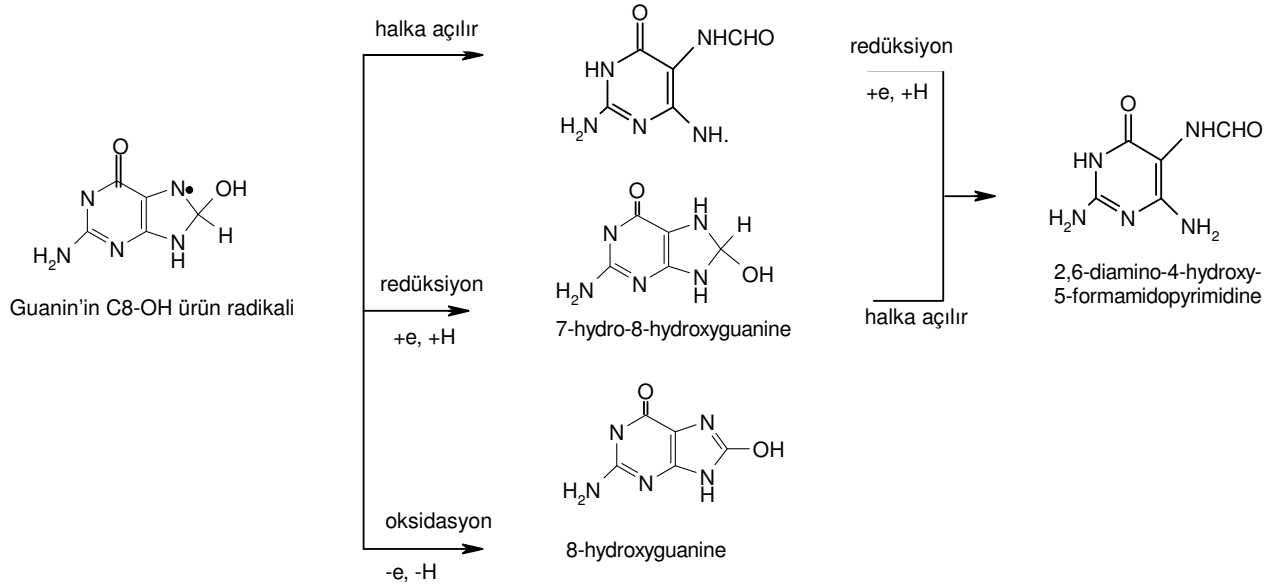
potansiyeline sahip bileşiktir. Bu sebeple de ROS'un başlıca hedefidir (9,17,18). DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (2,4,7,8,10-13,18-21). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır (1,4,10,16). 8-OHdG, 8-Hidroksiguanin (8-OHGua)'nin deoksiriboz'a bağlanmış hali olan bir modifiye nukleozit (10,12) ve ekzonukleazlar olarak adlandırılan enzimlerin okside olmuş DNA'yı onardığında ekstrakte edilen bir baz modifikasyonudur (23-25). 8-OHGua, bilinen mutajenik etkilerinden dolayı geniş olarak araştırılan bir diğer DNA lezyonudur. (4,14,18). Bu derlemenin, oksidatif DNA hasarına ve bunun bir göstergesi olan 8-OHdG'in önemine dikkat çekeceği inancındayız.

8-OHdG ve 8-OHGuanozin'ın Oluşum Mekanizması

8-OHdG, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROS veya eksojen kaynaklı ROS

tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir. (13,19,26-28). OH radikali, guanin'in 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluştururlar (Şekil 1). 4. ve 5. karbon atomunun OH ürün radikalleri dehidrate olmuş, 8. karbon OH ürün radikalının ise imidazol halkası açılmaya maruz kalmıştır.

DNA ürün radikalleri, son ürün oluşturmak için farklı mekanizmalarla daha fazla reaksiyon verirler (2). Oluşan DNA modifikasyon ürününün türü (son ürünler); reaksiyon partneri, redoks potansiyeli, radikal üreten sistem ve oksijenin mevcudiyeti gibi reaksiyon şartlarına bağlıdır. Radikaller sahip oldukları redoks potansiyellerine ve reaksiyon partnerlerine göre indirgenebilirler ya da yükseltgenebilirler. Purinlerin C8-OH ürün radikalleri bir elektron oksidasyonuna halka açılmadan maruz kalarak, 8-hidroksipurinleri ve bir elektron redüksiyonuna maruz kalarak formapirimidinleri verirler (2,5,10,13,14,18) (Şekil 2). 8-Hidroksipurinler [8-hidroksiguanine (8-OH-Gua) ve 8-hidroksadenine (8-OH-Ade)] ve formapirimidinler [2,6-



Şekil.2. C8-OH ürün radikalinden, guanin son ürünlerinin oluşum mekanizması (14)

diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) ve 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde)], hem oksijen yokluğunda hem de varlığında oluşabilmesine rağmen oksijenli ortamda oluşmayı daha fazla tercih ederler. Bu bileşikler hemioorthoamid'dirler ve kolayca birbirlerine dönüşebilirler (2,13,14,18).

8-OHdG Üretiminin Artışı

ROS üretiminin artmasına sebep olan tüm etkenler, 8-OHdG oluşumuna yani oksidatif DNA hasarına katkıda bulunur. Oksijen radikali üreten ajanlar; (sigara dumanı, asbestos, x-ışınları, okside olmuş doymamış yağ asitleri), gama ışını, sigara dumanındaki polifenoller, paraquat, kainik asit, dietilbutilesterol, benzen, fecapenene, furocoumarin hydroperoxide, H_2O_2 + UV ve Ni bileşikleri gibi maddeler tarafından, deoxyguanosin'den (dG) 8-OHdG oluşumu invitro olarak gösterilmiştir. Ayrıca kanserojen maddelerin verilmesinden sonra hayvan dokularında 8-OHdG düzeyinin arttığına dair bir çok araştırma mevcuttur (19,20,26-29).

Normalde memeli hücrelerinde, günde ortalama 10^4 - 10^5 8-OHdG rezidüsü oluşur (30). Oluşan hasar, vücuttaki onarım sistemi tarafından tamir edilir. Fraga adlı araştırmacı, 1 yaşındaki Fischer 344 ratların karaciğerindeki 8-OHdG lezyonlarının steady-state (bazal düzey= DNA hasarı ve hücrenin onarım sistemi arasındaki dengenin göstergesi) düzeyi 64.000 rezidü/hücre ya da yaklaşık olarak 1/224.000 baz olarak belirlemiş ve her gün hücrede 80 8-OHdG biriktiğini söylemiştir (7). Shigenaga adlı araştırmacı tarafından, farklı yaştaki F-344 ratlarının 5 farklı organında, 8-OHdG seviyesi ölçülmüş ve ortalama 45.000 rezidü/hücre olarak belirlemiştir (12). 2-4 aylık F-

344 ratlarından izole edilen DNA'lardaki bazal 8-OHdG düzeyi 32800 rezidü/hücre ($1,37$ 8-OHdG/ 10^5 dG) olarak belirlenmiştir (7,12). F344 ratların karaciğerlerindeki 8-OHdG düzeyi ($8-73$ 8-OHdG/ 10^6 dG), Sprague-Dawley ratlarının karaciğerinden izole edilen DNA'lardaki 8-OHdG sayısı ile aynı bulunmuştur (27).

Metabolik aktiviteye bağlı artan oksijen tüketimi sonucu artmış OH üretimi, vücut moleküllerinde oksidasyona neden olur. Dokuların oksijen tüketimi ile 8-OHdG bazal düzeyi arasında doğrusal bir oran vardır. Oksidatif hasar ürünü olarak kabul edilen 'Deoxyguanosine-Malondialdehid' in idrardaki miktarı ile Kg canlı ağırlık başına tüketilen oksijen miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunması (31) ve böbreklerde diğer organlara göre daha yüksek düzeyde 8-OHdG tespit edilmiş olması bu fikri desteklemektedir (12). Loft adlı bir araştırmacı tarafından sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada, vücut kütle indeksi arttıkça idrar 8-OHdG ekstraksiyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Erkeklerde (%29 fazla) ve zayıflarda 8-OHdG ekstraksiyon oranının yüksek çıkmasının olası nedeni olarak, metabolizmaya bağlı ROS üretimindeki artış sorumlu tutulmuştur (25). Shigenaga adlı araştırmacı, ratların 8-OHdG seviyesinin insanlara göre yüksek olmasının nedenini yüksek bazal metabolizmalarına bağlamıştır (8).

Yapılan araştırmaların ağırlıklı olarak desteklediği nokta, yaşlanma ile oksidatif DNA hasarı arasında doğrusal bir ilişki olduğudur. Yaşa bağlı olarak DNA'da 8-OHdG birikiminin, mutasyon sıklığının artmasında, organ fonksiyonlarının azalmasında, dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında ve tümör oluşum ihtimalinin artmasında

en önemli neden olduğu belirtilmiştir (7,12,25,29,32). Helbock adlı araştırmacı, yaşlı ratların karaciğer 8-OHdG düzeyinin, genç ratlardan 2.75 kat daha fazla bulunduğunu belirtmiştir (21). Fraga adlı araştırmacı yaşlanma boyunca farklı rat dokularının DNA' larındaki 8-OHGua seviyesinin değiştiğini belirtmiştir. Ancak 1 ve 24 aylık F-344 ratlarının beyin ve testis DNA' larındaki 8-OHGua düzeylerinde fark bulamamıştır (7). Shigenaga'da yaptığı bir çalışmada aynı bulguları bulmuştur. Yaşlanmada; karaciğer, böbrek ve bağırsaklardan izole edilen DNA' lardaki 8-OHdG'in bazal seviyesinin yaklaşık iki kat arttığı fakat beyin ve testis dokusunda değişmediği tespit edilmiştir (12).

Hirano (9) ve Dandona (1) adlı araştırmacılar ise diğerlerinden farklı olarak, doku 8-OHdG seviyesinde yaşa bağlı değişiklikler gözlemediklerini belirtmiştir. Farinati tarafından yapılan bir çalışmada, oksidatif DNA hasarı birikiminin yaş, sigara ve alkol kullanımına bağlı olarak değişmediği belirtilmiştir. Korelasyondaki bu eksikliğin nedeni olarak, çalışmadaki kontrollerin sağlıklı olmasından kaynaklandığını açıklamıştır. Bu yüzden yaş, sigara ve alkol kullanımı ile 8-OHdG düzeyi arasındaki ilişkinin maskelenmiş olabileceğini belirtmiştir (17).

Sigara dumanı serbest radikallerin bir karışımını içermektedir. Sigara içen kişilerin, serbest radikallerin sinsi etkilerinden dolayı artan kanser riski ile karşı karşıya kalacağı fikri güçlenmektedir (19,23,26,30). Sigara dumanı insan akyuvar hücresi DNA'sında (19,34) ve idrarında (25,35) 8-OHdG seviyesini artırır. Loft adlı araştırmacı, sağlıklı kişilerde yaptığı çalışmada, idrar 8-OHdG düzeyini sigara içenlerde yaklaşık %50 yüksek bulmuştur (25). 8-OHdG seviyesinin günde içilen sigara adedi ile doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir (19,35). İn vitro yapılan çalışmalarda izole edilen DNA'nın sigara dumanıyla okside olması bu fikri desteklemiştir. Ancak in vivo olarak yapılan insan çalışmalarında, sigara içiminin normalde metabolizmanın ürettiği ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar üzerine ilave bir şey eklediğine dair kesin kanıtlara ulaşılamamıştır. Sigara içen kişilerde 8-OHdG'in yükselmesinin bir çok sebebi olabilir, hücresel respirasyon oranının, içmeyenlere göre %10-15 daha yüksek olmasının serbest radikal oluşumuna neden olduğu, ayrıca antioksidanların tüketimi neticesinde de DNA hasarının arttığına dair fikirler bulunmaktadır (25). Ancak yine de sigara içenler arasında kanserin yaygın olmasının altında yatan en önemli nedenlerden birinin 'serbest radikaller tarafından DNA'nın okside olmasıdır' fikri için henüz çok erken olduğu belirtilmiştir. Sigara kullanmayan kişilerin lökosit DNA' larından elde edilen 8-OHdG seviyelerindeki 7 kata varan farklılıkların gözlenmesi, genetik faktörlerin ve yaşam tarzının da 8-OHdG düzeyi arttırabileceği fikrinin öne sürülmesine sebep olmuştur (19). Lagorio, bir

araştırmasında yaş, sigara kullanımı ve kanserojen maddelerle karşılaşmak zorunda kalan mesleklerdeki bireylerin çalışma süresinin üriner 8-OHdG seviyesi ile paralellik gösterdiğini belirtmiştir (29).

DNA hasarının bazal düzeyi, kanser etiyojisinde belki de en önemli parametredir (10,12,17,28,37-39). ROS'un DNA'da yaptığı oksidatif hasarın boyutları ve dolayısı ile kanser gelişimine olan katkısı, bir çok faktöre bağlıdır. Bunlar; DNA hasarının boyutu, antioksidan koruyucuların miktarı, DNA onarım sistemi ve büyük miktarlardaki ROS'un sitotoksik etkileridir (11). DNA onarım enzimlerinin hasara uğraması, hasarın birikmesine neden olarak, replikasyonun aksamasına ve sonuçta kanser oluşmasına neden olabilir.

Hava kirliliği içerdiği ozon, aldehid, metaller ve nitrojen oksitler nedeni ile DNA'da oksidatif hasara yol açar. Hava kirliliğine maruz kalmanın süresi ile oksidatif DNA hasarı arasında doğrusal bir oran vardır (11,36). Nagashima ve Ichinose adlı araştırmacılar, fare soluk borusuna dizel atıkları verilmesinin, uygulanan doza bağlı olarak 8-OHdG'nin önemli oranda artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Akciğer DNA'sında 8-OHdG birikiminin mutasyonların gelişiminde kritik bir faktör olduğunu, bununda akciğer kanseri oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (28,40). Ichinose adlı araştırmacı farklı olarak yüksek yağlı diyetin ve β -karotenin 8-OHdG oluşumuna etki ederek tümör gelişiminde rol oynayabileceğini öne sürmüştür (28). Tetrachloro-p-hydroquinone'a maruz bırakılan farelerde hepatokanser oluşumunda 8-OHdG'in arttığı bildirilmiştir (41). Farinati adlı araştırmacı, gastrik kanser oluşumunda 8-OHdG'in önemine yönelik yaptığı bir çalışmada, kronik gastritlerde dahi 8-OHdG miktarını arttırdığını, gastrik kanserlerde ise bu artışın daha da belirginleştiğini söylemiş ve hasarın prekanseröz mukozal değişikliklerin gelişmesi ile korelasyon halinde olduğu belirtmiştir (17). Güneşin neden olduğu nonmelanoma ve melanoma cilt kanserlerinin oluşumu ile 8-OHdG artışının ilişkili olduğu öne sürülmüştür (42). Yamamoto adlı araştırmacı, genital kanserli kadınlarda üriner 8-OHdG düzeyinin, kontrol grubundakilere göre yüksek ($p < 0.05$) olduğunu belirtmiştir (43). Lagrio adlı araştırmacı, benzen'e maruz kalma süresi ile idrar 8-OHdG seviyelerinin korelasyon gösterdiğini belirtmiştir (29). Kamp adlı araştırmacı, asbestoza bağlı ROS artışının DNA hasarına neden olabileceğini belirtmiştir (44). Fung adlı araştırmacı, asbestoz'un karsinogenezisin mekanizmasındaki önemine yönelik yaptığı bir çalışmada renal mezotelyal plevra hücrelerinde 8-OHdG miktarının önemli ölçüde arttığını belirlemiştir (20). Helicobacter pylori tarafından oluşturulan kronik inflamasyon neticesi ROS'un aşırı üretiminin, karsinojenik ve mutajenik değişikliklerin oluşmasından sorumlu olduğu belirtilmiştir (4,5,12,17).

Huang adlı araştırmacı, hemodialize bağlı gelişen kistik böbrek hastalığının bir komplikasyonu olan renal kanserlerin oluşum mekanizmasında, oksidatif DNA hasarının rolünü araştırmak için yaptığı bir çalışmada, 8-OHdG ile hemodializ arasında direkt bir ilişkinin bulunmadığını belirtmiştir. Kist içinde üretilen ROS'un bundan sorumlu olabileceğini ve hemodializ hastalarında, artmış 8-OHdG düzeylerinin kanser riskini arttırabileceği belirtilmiştir (37). Vitamin-E takviyesi yapılmış kronik hemodializ hastalarında oksidatif DNA hasarının azaldığı tespit edilmiş ve hemodializ komplikasyonlarından olan ateroskleroz, amiloidozis ve kanser riskinin azalmış olduğu belirtilmiştir (45).

ROS'un artan üretimi diabetik vasküler komplikasyonlara neden olabilir. Dandona adlı araştırmacı tarafından proteinurisi olmayan Diabetes Mellitus'lu (DM) hastalarda yapılan bir çalışmada, hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek oksidatif DNA hasarı gözlenmiştir. Bunun diabette aterogenezis ve hastalığın mikroanjyopatik komplikasyonlarının artmasına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (1). Hinokio adlı araştırmacı, komplikasyonlu İnsuline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM) hastalarında, idrar ve lökosit 8-OHdG seviyesinin, komplikasyonsuz hastalardan daha yüksek olduğunu belirtmiş. Hiperglisemi ile indüklenen artmış oksidatif stresin, diabetik komplikasyonların oluşumunda rol oynadığını belirtmiştir (46). Chan adlı araştırmacı, NIDDM' li hastalarda yaptığı bir çalışmada 8-OHdG artışı ile HbA_{1c}, lipid düzeyi, diabet periyodu, albumin ekstraksiyon oranı arasında bir ilişki bulunmadığını belirtmiştir. Ayrıca proli-feratif retinopatili hastalarda 8-OHdG düzeyinin, nonpro-liferatif retinopatili ve retinopatili olmayan hastalara göre önemli oranda yüksek bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada 8-OHdG' in mikrovasküler komplikasyon gelişimine katkıda bulunabileceği ve diabetik komplikasyonların önlenmesinde antioksidan tedavinin potansiyelinin araştırılması gerektiği belirtilmiştir (47).

Radyasyon synovektomisi uygulanmış artritli hastalarda, uygulamadan 4 saat önce ve 20 saat sonra yapılan lenfosit ve üriner 8-OHdG ölçümlerinde kontrol grubuna göre fark bulunamamıştır (48).

Toyokuni adlı araştırmacı, bakır verilen ratların dokularında 8-OHdG seviyesinin önemli oranda arttığını tespit etmiş ancak dokularda histopatolojik değişikliğe rastlayamamıştır. Sürekli yüksek dozda bakıra maruz kalmanın mutagenesis ve kanserogenezisi arttırabileceğini ve bakır zehirlenmelerinde 8-OHdG ölçümünün erken bir marker olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (36). Holmberg adlı araştırmacı, hemokromatozis'li hastaların idrarlarında 8-OHdG düzeyinin kontrol grubuna göre farklılık göstermediğini, bunda olası nedeni olarak

hastaların önemsiz bir demir yüküne sahip olmalarından kaynaklandığını belirtmiştir (49).

Chao adlı araştırmacı, yüksek irtifanın etkisine yönelik yapmış olduğu bir çalışmada, 8-OHdG seviyesinin oksijen tüketimine bağlı olarak arttığını ve bu kişilere antioksidan verilmesinin oksidatif DNA hasarını azalttığını belirtmiştir (50).

Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvılarında 8-OHdG seviyesinin düşük olduğu, 8-OHdG'in Alzheimer'a neden olmadığı ancak hastalığın teşhisinde oldukça yararlı olacağı belirtilmiştir (51). Koppale adlı araştırmacı, postmortem beyin dokusunda Alzheimer hastalarında 8-OHdG düzeyinde değişiklik gözlenmediğini belirtmiştir (52).

Tsuboi adlı araştırmacı, atopik dermatitisli hastalarda 8-OHdG seviyesinin kontrol grubuna göre önemli oranda yükseldiğini gözlemlemiştir (43). Ratlarda yapılan çalışmada, post iskemik kalp kasında 8-OHdG oluşumu gözlenmiş ve kalp iskemik reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde 8-OHdG'nin rol oynadığı belirtilmiştir (53).

Onarım ve Hasar Dengesi

DNA'da oksidatif hasar neticesi oluşan modifiye bazlar, mutajenik özelliklerinden dolayı hücreyi tehdit eden bir potansiyele sahiptir. Vücut, kendini bu oksidatif hasarın etkilerini azaltarak ya da oluşmuş lezyonları tamir ederek korur.

Çeşitli sebeplerle vücudun maruz kaldığı ROS, antioksidanlar ve antioksidan enzimler ile nötralize edilir. Oksidatif DNA hasarına karşı ikinci bir savunma yolu, DNA onarım mekanizmasıdır. Hasara uğramış biyomoleküller onarılır ya da yerlerine yenileri konulur. Onarım DNA'da kodlanan genetik bilginin doğruluğunun sürdürülmesi için özellikle önemlidir. DNA onarım mekanizmasına rağmen, insan dokularında oksidatif olarak modifiye olmuş DNA'lar bulunması gerçekte serbest radikal hasarının tam olarak engellenemediğini gösterir. İnsan dokularından izole edilen DNA'daki 8-OHdG ve diğer okside olmuş bazların oluşumu ve onarımı neredeyse birbirine eşittir. Bu oran vücut antioksidan durumuna bağlı olarak kişiden kişiye değişir (7,13,24,27,28,40,51,63). DNA hasar ürünleri çeşitli onarım yolları ile onarılır. Baz eksisyon onarımı DNA hasarının hafifletilmesinde en önemli yol olmasına rağmen, nükleotid eksisyonu, fotoreaktivasyon, rekombinasyon ve gen dönüşümü DNA bütünlüğünün sürdürülmesinde oldukça önemlidir. Baz eksisyon onarımı, nükleotidlerin yeniden sentezini içermektedir. DNA glikozilaz enzimleri, hasar görmüş baz ve şeker kalıntısı arasındaki glikozidik bağın ayrılmasını katalize ederek onarım yolunun ilk adımında görev alır. Bunu takiben diğer enzimler görev alır. Nükleotid boşluğu

DNA polimeraz tarafından doldurulur. Oluşan iki zincir DNA ligaz tarafından birbirlerine bağlanır ve DNA orijinal haliyle yeniden inşa edilmiş olur.

Son yirmi yıldır, hem prokaryot hem de ökaryotik hücrelerde bir çok DNA onarım enzimi keşfedilmiştir. Bazı enzimler pirimidinden türeyen lezyonlar için spesifikken bazıları da purinden türeyen lezyonlar için spesifiktir. Hem pirimidinden hem de purinden türeyen lezyonların uzaklaştırılmasında görevli onarım enzimleri de vardır. E.coli'de DNA baz ürünleri için spesifik bir çok DNA glikozilaz enzimi mevcuttur (58,59,63). Ökaryotik hücrelerde de bu enzimlerin homologları belirlenmiştir. Bu enzimlerin eksisyon kinetikleri, enzime ve DNA substratına göre değişir. İnsan hücrelerinde oluşan DNA lezyonlarının yarı ömrü 8-60 dakikadır. Bu sonuçlar farklı lezyonların, DNA'dan farklı eksisyon kinetikleri ile uzaklaştırıldığını gösterir. Pirimidin türevi lezyonların yarı ömürleri 8-HidroksiAdenin (8-OHAde) hariç purin türevi lezyonlardan daha kısadır (2).

Okside olmuş bazların düzeyi, sadece oksidatif DNA hasarının arttığı durumlarda değil aynı zamanda onarım oranındaki farklılıklara göre de değişiklikler gösterir (7,10). Bu bakımdan DNA onarım enzimlerindeki bir defektten dolayı kusurlu onarımın, DNA hasarına katkısı ihmal edilmemelidir (1). Ogg1 onarım enzimi yetmezliğine bağlı olarak fare genomunda 8-OHGua'nın anormal birikimi (2) ve insan akciğer, mide ve böbrek tümörlerinde Ogg1 geninde somatik ve polimorfik mutasyonlar gözlenmesi bu fikri desteklemektedir (14,38,39). Maternal diyetdeki azalmış çinko'nun, infant Rhesus maymun karaciğerinde 8-OHdG ve DNA zincir kırıklarını arttırdığı bunun olası nedeni olarak DNA onarım oranındaki azalma olduğu belirtilmiştir (29).

DNA onarım mekanizması ve endonukleaz aktivitesinde yaşla doğru orantılı olarak yetmezlikler gözlenir (12,29). Cand adlı araştırmacı tarafından yapılan bir araştırmada, dişi Wistar ratlarının karaciğer ve böbrek Superoksit dismutaz, Katalaz ve Glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinde, yaşa bağlı bir azalma saptanmış ve bunun oksidatif DNA hasarının artmasına neden olabileceğini belirtmiştir (33). Yaşa bağlı olarak, hasara uğramış nükleozidlerin bazal düzeyinin artması ve idrar ile ekstrakte edilen 8-OHdG seviyesinde azalma gözlenmiş olması, DNA onarım mekanizmasındaki yetmezliğin göstergesidir ve bu fikri desteklemektedir (12).

8-OHdG Ölçüm Metodları

Hücre ve dokularda, bir çok purin ve pirimidin lezyonunun tespiti ve miktar analizi yapılmıştır. DNA'da bu farklı ürünlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla bir çok analitik teknik kullanılmaktadır (2,5,7,18,26,27,32,54).

Son yıllardaki çalışmalar bir takım purin bazlarının okside olabileceğini ve elektrokimyasal olarak mükemmel duyarlılıkta tespit edilebileceğini göstermiştir. Sözü edilen bu teknik ilk defa Floyd ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (55). Floyd 'un bu tekniği sayesinde, 8-OHdG' nin idrarda, nuklear ve mitokodrial DNA'da bulunduğu gösterilmiştir (12,22). Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi elektrokimyasal dedektör (HPLC-EC) kullanılarak kantitatif 8-OHdG analizi, oksidatif DNA hasarının tespitinde son derecede duyarlı, seçici ve laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir. 20 fmol kadar 8-OHdG bu metod ile belirlenebilmektedir (2,10,15). Bu metodun duyarlılığı optikal metoda göre 2-3 kat daha fazladır (12,55). 8-OHdG'nin HPLC-EC ile analizinde sırasıyla, ekstrakte edilen DNA'nın enzimatik hidrolizi, hidrolizatın okside DNA analizi için hazırlanması ve kolona enjekte edilmesi işlemleri takip edilir. Bütün bu aşamalar DNA'nın yapay hasarı için potansiyel teşkil eder (21,27,56). Literatürde aynı materyalden elde edilmesine rağmen, DNA'daki 8-OHdG seviyeleri arasında önemli oranda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. HPLC-EC ile analiz sırasında ortaya çıkabilecek hataların minimize edilmesi, artifaktların kaynaklarının tespit edilmesi ve laboratuvar sonuçları arasındaki farklılığın elimine edilmesi için herkes tarafından kabul edilen protokollerin hazırlanmasını gerektirmektedir.

European Standarts Committee for oxidative DNA damage (ESCODD) 8-OHdG ölçümlerine bir standartizasyon getirmeye çalışmış bu amaçla calf thymus DNA'sı stok olarak kullanılmış ve bunun 8-OHdGua seviyesinin belirlenmesi için farklı laboratuvarlara göndermiştir. Gelen sonuçların birbirlerinden oldukça farklı olduğunu gözlemlenmiş ve bunun nedeninin farklı laboratuvarların ve farklı analiz tekniklerinin kullanılmış olması sonucuna varmışlardır (13,14,18,57).

Yapılan araştırmalar; DNA ekstraksiyon şartlarının unmodifiye bazların yapay oksidasyonuna sebep olarak hatalı sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir. DNA ekstraksiyonu sırasında fenol kullanımının yapay oksidasyona neden olduğu, kontaminasyon durumunda ölçümde kullanılan DNA miktarının az olmasının hata yüzdesini arttırabileceği, DNA'nın enzimatik hidrolizinde inkübasyon süresinin ve enzim miktarının deoksiniükleozid hidrolizini değiştirerek farklı sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir. Redoks aktif metallerin varlığının artifaktlara neden olabileceği ve ortama düşük molaritedeki desferal gibi bir şelatörün eklenmesinin geçiş metallerinden kaynaklanabilecek oksidasyonları engelleyebileceği belirtilmiştir (21).

İdrarda 8-OHdG miktarının ölçülmesi onarım miktarının artmasına bağlı olarak artabileceğinden yanıltıcı olabilir. Bu durum vücutta artmış bir DNA oksidasyonu varmış gibi algılanabilir. Ayrıca idrardaki 8-OHdG'in

köklenini diyetten almış olabileceği de ihmal edilmemelidir. Doku ve lökosit DNA'larında 8-OHdG miktarının analizi, bazal hasar düzeyini gösterir. (34). Bu bakımdan DNA'daki ölçümler tercih edilmelidir.

Bazı araştırmacılar oksidatif DNA hasarının biomarkeri olarak 8-OHdG'e tamamen güvenmenin sakıncaları olduğunu ve 8-OHdG'in oksidatif DNA hasarını tamamen yansıtmadığını savunmaktadırlar (1,10,27,58). Podmore adlı araştırmacı, sağlıklı kişilere 500 mg Vitamin-C verilmesini takiben lenfosit DNA'sında 8-OHdG düzeyinin azaldığını ama diğer bir oksidatif baz ürünü olan 8-OHAdE düzeyinin arttığını tespit etmiştir (59). Bir başka çalışmada sağlıklı kişilere askorbata ilaveten Fe verilmiştir. 6.haftada 8-OHdG seviyesinde değişme gözlenmezken, fapyguanine önemli oranda yükselmiştir. 12. haftada 8-OHdG düzeyi azalmış, FapyAde düzeyi ise normale dönmüştür (56).

Serbest radikallerin neden olduğu DNA baz hasarları ölçümü için GC/MS'ın (Gaz Kromatografi/Mass Spektrofotometri) uygun bir teknik olduğu 10 yıldan fazlaca bir süredir gösterilmiştir (58,60,61). Şimdiye kadar kullanılan ölçümler içerisinde GC/MS, invitro yada invivo hasara uğramış DNA'da ve direkt olarak kromatinin kendisinde, 4 bazda da oluşan hasar ürünlerinin geniş bir bant şeklinde belirlenmesine olanak sağlayan tek tekniktir. GC/MS'ın dezavantajı ise, derivizasyon işlemi sırasında Guanin'in de aralarında bulunduğu bazlardan bir bölümünde yapay oksidasyonların oluşmasıdır (1,28,60,61). GC/MS ile selected-ion monitoring (SIM) ile DNA hasar ürünlerinin düşük konsantrasyonlarını ölçmek mümkündür. Bu teknik ile 5 fmol'dan daha düşük seviyelerdeki 8-OHdG belirlenebilmektedir (5,54,60,62).

HPLC-EC ile elde edilen sonuçların, GC/MS ile elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşük bulunmasının olası nedeni olarak, HPLC-EC ile analizde enzimatik hidrolizin yetersizliğine bağlanmış olmasına rağmen bu konu kanıtlanmış değildir (27,57,63). Likit Kromatografi-Mass Spektrofotometri (LC/MS) kullanılan metodlar hızla gelişmekle beraber yine de biyomarker çalışmalarında rutin kullanıma uygun değildir. GC/MS ve LC/MS ile 8-OHdGua ölçümünün karşılaştırılmasında, GC/MS'in daha hassas olduğu belirtilmiştir (13).

8-OHdG'nin doğru ve kesin ölçümüne yönelik daha farklı analiz yöntemleri de denenmiştir. DNA hasar ürünlerinin spesifik tiplerinin kantitatif analizi için immunoassay yöntemleri geliştirilmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemin sınırlı bilgi verdiği belirtilmiştir (11,61). Bu yöntemde 8-OHdG boyanması monoklonal antikorlar kullanılarak yapılır ve 8-OHdG düzeyi boyamanın yoğunluğuna bağlı olarak değerlendirilir ancak hasarın kantitatif düzeyini göstermez (11,37). Poliklonal ve monoklonal antikorları içeren benzer bir yaklaşım olan immunoafinite yöntemi 1991 de Degan

tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem ile üriner 8-OHdG ve 8-OHGua ölçümünde, kolonda bulunan poliklonal antikorların yüksek seçiciliği sayesinde, solid faz ekstraksiyonu sırasında gözlenebilen üriner kontaminantların etkisinin azaldığını belirtmiştir (64).

Sonuç

İnsan ve hayvanlar yaşamları boyunca sürekli olarak, hem normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen ROS'un, hem de eksojen kaynakların neden olmuş olduğu ROS'un tahribatlarına maruz kalmaktadır. Normal koşullarda oluşan hasarın büyük bir kısmının onarılmasına rağmen, bir kısım okside bazlar birikir. Onarım DNA'da kodlanan genetik bilginin doğruluğunun sürdürülmesi için özellikle önemlidir ama hiçbir zaman yeterli değildir (10,12,17). Okside bazların bazal düzeyi, yaşa, onarım sistemi yetmezliklerine ve düşük antioksidan diyet alımına bağlı olarak artar.

Oksidatif DNA hasarının bir biyomarker olarak kullanımı, antioksidanların koruyucu rolünün tespitinde ve diyetteki antioksidan suplementasyonun optimal seviyesini seçmemize yardımcı olabilir (10,23).

Oksijen radikalleri oluşturan kimyasalların verilmesinden sonra hayvan organ DNA'sında 8-OHdG analizleri bu maddelerin karsinojenik risklerinin değerlendirilmesinde fayda sağlar. İdrarda ve lökosit DNA'sında 8-OHdG analizi oksidatif strese bağlı bireysel kanser riskinin ölçümü için yeni bir yaklaşımdır (19,26,27,38,39).

DNA onarım sisteminde yer alan, DNA onarım enzimlerinin çoğu izole edilerek saflaştırılmıştır (14). Bu enzimlerinin tiplerini, substrat spesifitelerini ve eksiyon kinetiklerini belirlemek için bir çok araştırma gereklidir. Bu enzimler antiviral ve antikanser ilaçların gelişiminde rol alabilir.

Kanser oluşumunda, oksidatif DNA hasarının rolünün bilinmesi rasyonel terapötik müdahaleleri olası kılabilir. Farklı hastalıklardaki oksidatif DNA hasarının belirlenmesi, hastalıkların etiyojilerinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına katkıda bulunabilir. Elde edilen sonuçlar ile bu hastalıklarda görülen semptomlar ve komplikasyonlar arasındaki ilişkiler ortaya konulabilir.

Modifiye bazlardan bir kaçının premutajenik özelliğe sahip olduğunun gösterilmesine rağmen, baz modifikasyonlarının çoğunun biyolojik özellikleri, mutagenesis ve karsinogenezisteki rolleri bilinmemektedir ve bu konular üzerinde araştırmalar yapılması gerekmektedir (14,15).

KAYNAKLAR

1. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B et.al. Oxidative damage

- to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-5.
2. Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair*. Kluwer Academic/Plenium Publishers. Newyork. 1999; 67-87.
 3. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Rad Biol* 1987; 51:573-89.
 4. Senturkler S, Dizdaroglu M. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by GC/MS: How many modified bases are involved? Purification or not?. *Free Radic Biol.&Med.* 1999; 27:3/4 370-80.
 5. Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Rad Res* 1998; 29: 551-63.
 6. Dizdaroglu M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in Enzymology* 1994; 234: 3-16.
 7. Fraga C, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 1990; 87: 4533-7.
 8. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 9697-701.
 9. Hirano T, Yamaguchi R, Asami S, Iwamoto N, Kasai H. 8-Hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *The Journal of Gerontology* 1996; 51: 303-8.
 10. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutrition Reviews* 1999; 57(4): 104-13.
 11. Calderon GL, Wen-wang L, Zhang YJ, Rodriguez AA, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect* 1999; 107(6): 469-74.
 12. Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol&Med* 1991; 10: 211-6.
 13. Rodriguez H, Jurado J, Laval J, Dizdaroglu M. Comparison of the levels of 8-hydroxyguanine in DNA as measured by gas chromatography mass spectrometry following hydrolysis of DNA by *Escherichia coli* Fpg protein or formic acid. *Nucl Acids Res* 2000; 28:15-75.
 14. Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y. Oxidative DNA damage: Mechanisms of product formation and repair by base-excision pathway. *Free Radicals In Chemistry Biology And Medicine*. London U.K.: Oica International Limited, 2000: 58-76.
 15. Jaruga P, Speina E, Gackowski D, Tudek B, Olinski R. Endogenous oxidative DNA base modifications analysed with repair enzymes and GC/MS technique. *Nucleic Acid Res* 2000; 28(6): 16-20.
 16. Loft S, Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and molecular damage. *Methods In Enzymology* 1999; 300:167-84.
 17. Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, et al. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut.* 1998; 42(2):351-8.
 18. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(3): 1-8.
 19. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research.* 1997; 387: 147-63.
 20. Fung H, Kow YW, Houten BV, Mossman BT. Patterns of 8hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 1994; 18(4): 825-32.
 21. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters; The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(1):288-93.
 22. Kasai H, Nishiura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucl Acids Res* 1984; 12: 2137-45.
 23. Halliwell B, Zentella A, Erika OG. Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews* 1997; 55: 44-54.
 24. Cadet J, d'Ham C, Douki T, et al. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res* 1998; 29: 541-50.
 25. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992; 13(12): 2241-7.
 26. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence its repair. *Carcinogenesis* 1986; 7(11): 1849-51.
 27. Nakajima M, Takeuchi T, Morimoto K. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis* 1996; 17(4): 787-91.
 28. Piperakis SM, Visvardis EE, Tassiou AM. Comet assay for nuclear DNA damage. *Methods In Enzymology* 1999; 300: 184-91.
 29. Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, Iavarone I, Axelson O, Carere A. Exposure to benzen and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup and Enviro Med* 1994; 51:739-43.
 30. Ames BN, Shigenaga K, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Nail Acad Sci USA.* 1993; 90(17): 7915-22.
 31. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters; The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(1):288-93.
 32. Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Rad Res Commun.* 1989; 7: 121-8.
 33. Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic Biol Med* 1989; 7:59-63.
 34. Loft S, Deng XS, Tuo J, et al. Experimental study of oxidative DNA damage. *Free Radic. Res* 1998; 29:541-50.
 35. Kiyosawa H, Suko M, Okudaria H, et al. Cigarette smoking induces formation of 8OhdG, one of the oxidative DNA damage, in human peripheral leukocytes. *Free Radic Res.* 1990; 11:23-7
 36. Lunec J. ESCODD: European Standarts committee on Oxidative DNA Damage. *Free Radic Res* 1998; 29: 601-8.
 37. Huang XB, Ito F, Nakazawa H, Toma H. Increased expression of 8-hydroxydeoxyguanosine in acquired cystic disease of the kidney. *Nephron.* 1999; 81(4): 458-59.
 38. Audebert M, Radicella JP, Dizdaroglu M. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucl Acids Res* 2000; 28(14): 2672-8.
 39. Dherin C, Dizdaroglu M, Doerflinger H, Boiteux S, Radicella JP. Repair of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*: Identification and characterization of dOgg1, a

- second DNA glycosylase activity for 8-hydroxyguanine and formamidopyrimidines. *Nucl Acids Res* 2000; 28(23): 4583-92.
40. Nagashima M, Kasai H, Yokota J. Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in mouse lung DNA after intratracheal installation of diesel exhaust particles and effects of high dietary fat and beta-carotene on this process. *Carcinogenesis* 1995;16:1441-5.
41. Dahlhaus M, Almstadt E, Henschke P, Luttgert S, Appel KE. Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single strand breaks in DNA of U79 cells by tetrachloro-p-hydroxyquinone. *Mutat Res* 1995; 329:29-36.
42. Kvam E, Tyrell RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2379-84.
43. Yamamoto T, Hosokawa K, Tamura T, Kanno H, Urabe M, Honjo H. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OhdG) levels in women with or without gynecologic cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 1996; 22(4):359-63.
44. Kamp DW, Weitzman SA. The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax* 1999; 54(7):638-53.
45. Tarnag DC, Huang TP, Liu TY, Chen HW, Sung YJ, Wei YH. Effect of vitamin E-bonded membrane on the deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2000; 58(2): 790-9.
46. Hinokio Y, Suzuki S, Chiba M, Hirai M, Toyota T. Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42(8):995-8.
47. Chan SS, Moon BS, Park KS, Park SJ, Chung MH, Lee HY. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in Diabetic patients. *Diabetes Care* 2001; 24(4):733-7.
48. Pirich C, Pilger A, Schwameis E, et al. Radiation synovectomy using ¹⁶⁵Dy ferric-hydroxide and oxidative DNA damage in patients with different types of arthritis. *The Journal of Nuclear Med* 2000; 141(2): 250-6.
49. Holmberg I, Stal P, Hamberg M. Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine by isotope dilution mass spectrometry: normal levels in hemochromatosis. *Free Radic* 1997; 26(6):507-14.
50. Chao WH, Askew EW, Roberts DE, Wood SM. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *The Journal of Nutrition* 1999; 129(11): 2009-12.
51. Arrastia RD, Baskin F. New biochemical markers in Alzheimer disease. *Archives of Neurology.* 2001; 58(3):354-6.
52. Kopple JM, Lucassen PJ, Sakke AN, Van Asten JG, Ravid R, Swaab DF. 8OhdG levels in brain do not indicate oxidative DNA damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1996; 17(6):819-26.
53. Cordis GA, Maulik G, Bagchi D, Riedel W, Das DK. Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxy-2'-guansine formation. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(10):1939-44.
54. Dizdaroglu M, Jargua P, Rodriguez H. Identification and quantification of 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2001; 27:370-80.
55. Floyd RA, Watson J, Wong PK. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine:sensitive detection and mechanism of formation. *Free Radical Res.Commun* 1986; 1: 163-72.
56. Rehman A, Collis CS, Yang M, et al. The effects on iron and vitamin C co-supplementantation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:293-8.
57. Okezie IA, Halliwell. Mechanism of free radical damage to DNA, DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms&Applications. 1998 Oica International limited.Saint lucia . London. 1-26.
58. Halliwell B. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? *Free Radic Res.* 1998; 29:469-86.
59. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert TE. Vitamin C exhibits prooxidant properties. *Nature* 1998; 392:559.
60. Adelman R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA:relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci.USA.* 1988; 85: 2706-8.
61. Fraga C, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 1990; 87: 4533-7.
62. Lovell MA, Markesbery WR. Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid. *Archives of Neurology* 2001; 58(3): 392-8.
63. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989; 125-32.
64. Degan P, Shigenaga MK, Park EM, Alperin PE, Ames BN. Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies. *Carcinogenesis.* 1991; 12(5): 865-71.

Geliş Tarihi: 21.12.2001

Yazışma Adresi: Dr.Beran YOKUŞ
Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya AD,
21280 DIYARBAKIR
beyokus@dicle.edu.tr