

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÜRİNER SİSTEM KANSER HASTALARINDA CERRAHİ TEDAVİ  
ÖNCESİ ve SONRASI İDRAR 8-HİDROKSİDEOKSİGUANOZİN  
(8-OHdG) SEVİYELERİ**

DOKTORA TEZİ

**Adem ÜNAL**

Tez Yöneticisi:  
Doç. Dr. A. Banu SANCAK

ANKARA  
Eylül 2007

## TEŞEKKÜR

Uzun yıllardır beraber çalıŐtıđım değerli hocam Doç. Dr. A. Banu Sancak'a; eğitimim sırasında gösterdiği titizliği, yol göstericiliği, bilgi ve deneyimlerini paylaŐtıđı ve en önemlisi desteği için saygı ve teŐekkürlerimi sunarım.

Başta anabilim dalı baŐkanı Prof. Dr. Hatice PaŐaođlu olmak üzere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ğretim üyelerine, tez çalıŐmamın deney aŐamasındaki değerli katkıları için roloji Anabilim Dalı ğretim yesi Doç. Dr. Sinan Szen ve ArŐ. Gör. Dr. Sedat Akyüz'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi çok isteyen ve bunun için ellerinden geleni yapan aileme ise sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	i
İçindekiler .....	ii
Tablo, Şekil, Grafik, Resim Listesi .....	iv
Semboller, Kısaltmalar.....	vi
<b>1 GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>2</b>
2.1 Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	2
2.1.1 ROS ve RNS'nin Kaynakları ve Reaksiyonları .....	3
2.2 Metal İndükleyici Oksidatif Stres .....	6
2.3 Biyomoleküllerin Oksidatif Hasarı.....	10
2.3.1 Lipit Peroksidasyonu.....	10
2.3.2 Protein Oksidasyonu.....	10
2.3.3 DNA Hasarı.....	12
2.4 Oksidatif Stres ve Kanser.....	16
2.4.1 Reaktif Türler ve Hücre Proliferasyonu .....	16
2.4.2 Apoptozisin Reaktif Türler ile Düzenlenmesi.....	17
2.4.3 Metastaz ve Reaktif Türler .....	17
2.4.4 Malign Hücrelerde Pro-Oksidan Durum .....	18
2.4.5 Oksidatif Stres, Hücre Sinyal İletimi ve Kanser .....	19
2.5 Üç Evre Modeli ve Karsinogenez Mekanizması .....	21
2.6 Antioksidan Savunma .....	23
2.6.1 Enzimatik Antioksidanlar.....	23
2.6.1.1 Süperoksit Dismutaz .....	23
2.6.1.2 Katalaz.....	24
2.6.1.3 Glutasyon Peroksidaz.....	25
2.7 DNA Hasarının Ölçülmesi .....	25
2.7.1 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG).....	25
2.7.2 Timin glikol (Tg) .....	26
2.7.3 5-hidroksiurasil (5-OHUra) .....	26
2.7.4 8-oxoadenin (8-oxoA) .....	26
2.8 İdrar 8-OHdG Nasıl Ölçülür.....	27
2.8.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	27
2.8.2 Tandem Mass Spektrometre.....	28
2.8.3 ELISA.....	28
2.9 Ürolojik Kanserler ve Sınıflandırılması .....	28
2.9.1 Prostat Kanseri .....	28
2.9.2 Mesane Kanseri .....	29
2.9.3 Böbrek Hücreli Karsinom .....	30
<b>3 GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1 Kullanılan Gereçler.....	32
3.1.1 Hasta Grupları.....	32
3.1.2 Kullanılan Aletler .....	35
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar.....	35

3.2	Uygulanan Yöntemler.....	35
3.2.1	Metotların Uygulanması .....	35
3.2.1.1	İdrar Kreatinin Ölçülmesi.....	35
3.2.1.2	İdrar 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG) Ölçülmesi.....	36
3.3	İstatistiki Analiz.....	40
4	<b>BULGULAR</b> .....	<b>41</b>
5	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>47</b>
6	<b>SONUÇ</b> .....	<b>51</b>
7	<b>ÖZET</b> .....	<b>52</b>
8	<b>SUMMARY</b> .....	<b>53</b>
9	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>54</b>
10	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>70</b>

## Tablo Listesi

Tablo 1: Reaktif oksidan türleri .....	2
Tablo 2: Oksidatif hasar tamiri .....	15
Tablo 3: Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri.....	24
Tablo 4: Prostat kanseri TNM sınıflandırması.....	29
Tablo 5: Mesane kanserinin 2002 TNM sınıflandırması.....	30
Tablo 6: Böbrek hücreli karsinom 2002 TNM sınıflandırması .....	31
Tablo 7: Hasta özellikleri.....	32
Tablo 8: Grup I ve II hasta özellikleri.....	33
Tablo 9: 8-OHdG standartları .....	37
Tablo 10: Grupların 8-OHdG ve 8-OHdG / Kreatinin değerleri .....	41
Tablo 11: Gruplar arası 8-OHdG ve 8-OHdG/Kreatinin p değerleri.....	42
Tablo 12: Grup I tanıya göre p değerleri .....	43
Tablo 13: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG ve 8-OHdG/kreatinin ortalamaları.....	46

## Şekil Listesi

Şekil 1: Serbest radikal hasarı ürünleri .....	8
Şekil 2: Reaktif türlere maruz kalma süresine göre hücresel cevap.....	9
Şekil 3: Lipit peroksidasyonunda çeşitli yollar .....	11
Şekil 4: Guanin'in hidroksil radikali ile reaksiyonu .....	12
Şekil 5: Guanin'in RNS ile reaksiyonu .....	13
Şekil 6: Reaktif türlerin kanser gelişimini kolaylaştırmasını gösteren bazı yollar .....	14
Şekil 7: Nonspesifik endonükleazlar ve spesifik glikozilazlarca DNA hasarının tamiri.....	15
Şekil 8: p53 proteinin pro- ve antioksidan fonksiyonları .....	16
Şekil 9: ROS ve metal iyonlarının indüklediği sinyal yolları.....	20
Şekil 10: Karsinogenezin üç evre modeli ve karsinojenik etkilerin seviyesi & karsinojenik sürecin çeşitli evrelerinde serbest radikal seviyeleri .....	22
Şekil 11: 8-OHdG ve analoglarının kimyasal yapıları.....	27
Şekil 12: 8-OHdG standart eğrisi .....	37
Şekil 13: Hiçbir işlemde geçmemiş 125 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram.....	37
Şekil 14: 62,5 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram .....	37
Şekil 15: 125 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram .....	38
Şekil 16: Akış şeması .....	39
Şekil 17: Bir hastaya ait kromatogram .....	40

## Grafik Listesi

Grafik 1: Grup I hasta dağılımı.....	34
Grafik 2: Grup II hasta dağılımı.....	34
Grafik 3: Grupların 8-OHdG ortalamaları .....	41
Grafik 4: Grupların 8-OHdG / Kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması.....	42
Grafik 5: Grup I 8-OHdG ortalamaları .....	44
Grafik 6: Grup I 8-OHdG / Kreatinin ortalamaları .....	44

Grafik 7: Grup II 8-OHdG ortalamaları .....	45
Grafik 8: Grup II 8-OHdG / Kreatinin ortalamaları .....	45
Grafik 9: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG / Kreatinin düzeyleri.....	46
Grafik 10: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG / Kreatinin düzeyleri.....	46

### **Resim Listesi**

Resim 1: Thermo Finnigan HPLC cihazı ve elektrokimyasal dedektör .....	36
--	----

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As•: Dimetilarsinik radikali  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsOO•: Dimetilarsinik peroksil radikali  
<sup>-</sup>OCI: Hipoklorit  
•OH: Hidroksil radikali  
<sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub>: Singlet oksijen  
4-HNE: 4-hidroksi-2-nonenal  
5-OHUr: 5-hidroksiurasil  
8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin  
8-OHG: 8-hidroksiguanozin  
8-OH-G=8-OHGua=8-oxoGua=8-oxoG: 8-hidroksiguanin  
8-oxoA: 8-oxoadenin  
AB: Avrupa Birliği  
Akt: Protein kinaz B  
AP: Apürinik/apirimidinik  
As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Arsenik trioksit  
BHK: Böbrek hücreli karsinom  
BPH: Benign prostat hiperplazisi  
CAT: Katalaz  
CIS: Karsinoma insitu  
CuZnSOD: Bakır, çinko süperoksit dismutaz  
ELISA: Enzim bağlı immun assay  
ER: Endoplazmik retikulum  
GIS: Gastrointestinal sistem  
GJIP: Gap junction  
GPx: Glutasyon peroksidaz  
GSH: Glutasyon  
GSSG: Okside glutasyon  
GST: Glutasyon-S-transferaz  
H<sub>2</sub>O: Su  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
HIF1: Hipoksi ile indüklenen faktör 1  
hMTH1: İnsan MutT homolog protein 1  
hNTH1: İnsan homolog endonükleaz III  
hOgg1: 8-oxoguanin DNA glikozilaz 1  
HOO•: Hidroperoksil  
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi  
L(R)O•: Alkoksil  
L(R)OO•: Peroksil  
L(R)OOH: Hidroperoksit  
LPN: Laporoskopik parsiyen nefrektomi  
MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz  
MDA: Malondialdehit  
MMP: Metalloproteinaz  
MnSOD: Mangan süperoksit dismutaz

mtDNA: Mitokondrial DNA  
NFAT: Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü  
NO•: Nitrik oksit  
NO<sub>2</sub>Cl: Nitril klorid  
NOS: Nitrik oksit sentaz  
NOX: NADPH oksidaz  
O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> : Süperoksit  
ONOO<sup>-</sup> : Peroksinitrit  
PI3: Fosfoinozitol 3  
PTEN: Fosfataz ve tensin homolog  
PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri  
RNS: Reaktif nitrojen türleri  
ROS: Reaktif oksijen türleri  
RRP: Retropubik prostatektomi  
SD: Standart deviasyon  
SOD: Süperoksit dismutaz  
SPSS: Statistical Package for Social Sciences  
Tg: Timin glikol  
TurM: Transüretal mesane rezeksiyonu  
TurN: Transüretal elektro rezeksiyon  
TurP: Transüretal prostat rezeksiyonu  
UICC: The Union International Contre le Cancer  
XO: Ksantin oksidaz



## 1 GİRİŞ

Oksidatif stres ve antioksidanlar günümüzde yaygın çalışılan konulardır. Oksidatif stres kısaca; oksidan üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanabilir<sup>1</sup>. Oksidatif stresin başlıca kaynağı olan oksidanlar reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), sülfür merkezli radikaller ve diğerleri olarak sınıflandırabilir<sup>3</sup>.

ROS ve RNS biyolojik sistemlerin hem yararına hem de zararına çalışan bileşiklerdir<sup>4</sup>. ROS düşük konsantrasyonda mitojenik etkiye sahip iken yüksek konsantrasyonda hücrenin protein, nükleik asit lipid ve membran gibi yapılarına zarar verir<sup>5</sup>. Bu oksidatif hasarın birikerek artması sonucu lipitler, proteinler ve DNA'da bozulmalar görülür. Bu değişiklikler kanser, ateroskleroz, artrit, nörodejeneratif hastalıklar gibi durumların gelişmesinde önemli rol oynar<sup>1</sup>.

ROS ve RNS hücre içerisindeki pek çok yapıya zarar verir fakat ana hedefi DNA'dır. Bu sebeple de yaşlanma ve kanser sürecinde önemli rol oynar<sup>76</sup>. ROS; tek veya çift zincir DNA kırığına, pürin ve pirimidinlerde modifikasyonlara, deoksiriboz-fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlantılarına neden olabilir. DNA hasarı transkripsiyonun indüklenmesi veya durması, sinyal yollarının indüklenmesi, replikasyon hataları ve genomik instabilite ile sonuçlanır. Bütün bunlar da karsinogenez ile ilişkilidir<sup>77-80</sup>. Hidroksil radikali DNA'da bulunan dört baz ile de reaksiyona girebilir<sup>77</sup>, ancak guanin en kolay oksitlenebilen bazdır<sup>84-86</sup>.

Organizmada oluşan DNA hasarını ölçebilmek için kullanılan değişik belirteçler ve yöntemler vardır. Bu belirteçler içinde en çok kullanılanlar 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), timin glikol (Tg), 5-hidroksiurasil (5-OHUr) ve 8-oxoadenin (8-oxoA)'dir. Çalışmamız için 8-OHdG'ni tercih etmemizin sebebi; 8-OHdG oluşumunun organizmaya, ROS tipine ve etkiye maruz kalma süresine bağlı olmaksızın diğer DNA modifikasyonları ile orantılı olmasıdır. Bu yüzden 8-OHdG ölçülerek oksijen radikallerinin indüklediği hasarın hesaplanması çok kullanışlı olacaktır<sup>165</sup>.

Bu çalışmanın amacı sağlıklı bireylerdeki 8-OHdG seviyeleri ile benign ve malign tümör kaynaklı 8-OHdG seviyelerini karşılaştırmaktır. Ayrıca cerrahi girişim ile tedavi edilen malign vakalardaki 8-OHdG seviyesi düzeylerini araştırmaktır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres, oksidan üretimi ve organizmanın kendi savunma sistemi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir<sup>1</sup>. Bütün hücreler sürekli olarak endojen ve ekzojen kaynaklı oksidantlara maruz kalırlar ve in vivo ortamlarda serbest radikaller üretirler<sup>2</sup>.

Oksidantlar, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), sülfür merkezli radikaller ve diğerleri olarak sınıflandırılabilirler. Ancak bütün reaktif türler radikal değildir. Fakat bu radikal olmayan reaktif türler pek çok durumda radikal gibi davranırlar ve biyomoleküllere oksidasyon yolu ile zarar verirler. Bu tehlikeli reaksiyonlar sonucunda oluşan oksidasyon ürünlerine radikaller denir ve bunlar başka reaksiyonların oluşmasına neden olarak daha büyük hasarlar meydana getirirler<sup>3</sup>.

Tablo 1: Reaktif oksidan türleri<sup>3</sup>

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	•OH	Peroksinitrit	ONOO <sup>-</sup>
Alkoksil	L(R)O•	Hipoklorid	•OCI
Hidroperoksil <sup>a</sup>	HOO•	Hidroperoksit <sup>b</sup>	L(R)OOH
Peroksil	L(R)OO•	Singlet oksijen	<sup>1</sup> ΔO <sub>2</sub>
Nitrik Oksit <sup>c</sup>	NO•	Hidrojen peroksit <sup>d</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit <sup>d</sup>	O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>		

<sup>a</sup> Hidroperoksil radikali süperoksit anyonunun konjuge asididir ve sulu ortamlarda konsantrasyonu pH'a bağlıdır.

<sup>b</sup> Geçiş metal iyonları varlığında hidroperoksit, alkoksil ve peroksil radikallerine dönüşür.

<sup>c</sup> NO• kendi başına reaktif değildir ve lipit peroksidasyonunda antioksidan gibi davranır. Süperoksit varlığında peroksinitrite dönüşür ki bu formu güçlü bir oksitleyicidir.

<sup>d</sup> Süperoksit iyi bir oksidan olmaktan ziyade redüktandır. Geçiş metal iyonlarını hem okside hem de redükte edebilir ve bu iyonların varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin •OH'a dönüşmesine sebep olur.

ROS ve RNS'nin biyolojik sistemlerde hem yararlı hem de zararlı olmak üzere iki çeşit etkileri bulunmaktadır<sup>4</sup>. ROS'un fizyolojik yararlı etkileri arasında enfekte ajanlara karşı savunma ve hücrel sinyal sisteminde değişik fonksiyonlar sayılabilir. Buna ilaveten ROS düşük konsantrasyonlarda mitojenik cevabı başlatır. Buna karşılık yüksek konsantrasyondaki ROS lipitler ve membranlar, proteinler, nükleik asitler (oksidatif stres) gibi hücrenin önemli yapılarına zarar verir<sup>5</sup>. ROS'un bu zararlı etkileri non-enzimatik ve enzimatik antioksidanlarla dengelenir<sup>6</sup>. Hücredeki antioksidan savunma sistemine rağmen oksidatif hasar hücrenin yaşam döngüsü boyunca birikir ve radikal hasarına bağlı olarak DNA, protein ve lipitlerdeki bozulmalar yaşa bağlı görülen hastalıkların

gelişmesinde (kanser, ateroskleroz, artrit, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer durumlar) önemli rol oynar<sup>1</sup>.

Oksidanlar pek çok değişik yolla meydana gelebilirler: (i) UV, X ve gama ışınları ile oluşan iyonize radyasyon; (ii) metal katalizörlü reaksiyon ürünleri; (iii) hava ve suyu kirleten kimyasallar; (iv) inflamasyon sırasında oluşan nötrofil ve makrofaj ürünleri; (v) mitokondrideki elektron transport sistemi ürünleri ve diğer mekanizmalar<sup>7</sup>.

### 2.1.1 ROS ve RNS'nin Kaynakları ve Reaksiyonları

Serbest radikaller, yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren molekül veya molekül grupları olarak tanımlanırlar. Yapısında eşleşmemiş elektron içeren bu serbest radikaller yüksek derecede reaktif olma eğilimindedirler. Bu radikallerin en önemlileri canlı sistemlerde oksijen ile elde edilmektedirler<sup>4</sup>.

ROS hem endojen hem de ekzojen maddelerden üretilmektedir. Endojen kaynaklar içerisinde mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatuvar hücre aktiviteleri bulunur<sup>8</sup>. Mitokondrinin yüksek oranda hidrojen peroksit ürettiği uzun süredir bilinmektedir. Ancak hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron içermez ve bu nedenle de radikal bir tür değildir. Fizyolojik şartlar altında hidrojen peroksit üretimi için organizmadaki oksijenin ~%2'si kullanılır. Bununla birlikte mitokondrideki yüksek SOD aktivitesi nedeniyle meydana gelen süperoksit radikalini ölçmek çok zordur.

Mitokondri serbest radikal üretiminde önemli bir organel olduğu için yapısında yüksek miktarda antioksidan (glutasyon (GSH)) ve antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx)) içerir. Bu enzimler mitokondri membranının her iki tarafında da bulunur ve organeli oksidatif stresten korur<sup>9</sup>. Süperoksit radikali mitokondri iç membranının her iki tarafında bulunan CuZn-SOD (SOD1, membranlar arası boşlukta bulunur) ve Mn-SOD (SOD2, matrikste bulunur) ile önce hidrojen peroksit sonra da suya dönüştürülerek zararsız hale getirilir.

Mitokondride bir başka süperoksit radikal kaynağı olan ksantin oksidaz (XO) enzimi de bulunmaktadır. XO çok yönlü bir enzim olup bakteriden insana kadar pek çok türde ve memelilerde değişik dokularda bulunur<sup>10</sup>. XO, oksijen serbest radikalleri için önemli bir kaynaktır. XO, hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit reaksiyonunu katalizler. Her iki adımda da moleküler oksijen kullanır ve birinci adımda süperoksit anyonu, ikinci adımda hidrojen peroksit oluşur<sup>4</sup>.

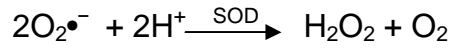
Nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar diğer endojen ROS kaynaklarıdır. Aktive makrofajlarda oksijen tüketimi yükselir ve dolayısıyla

süperoksit anyonu ve nitrik oksit gibi radikalleri ile hidrojen peroksit açığa çıkar<sup>11</sup>. Sitokrom P450'de endojen ROS kaynağı olarak düşünülebilir. P450'nin katalitik döngüsünde meydana gelen bir ayrılma veya aksamada süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumu olasıdır. Ayrıca mikrozomlar ve peroksizomlarda endojen ROS kaynağıdır. Mikrozomlar in vivo hiperoksia alanlarında üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %80'inden sorumludur<sup>12</sup>. Peroksizomların fizyolojik şartlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ürettiği bilinmektedir.

ROS üretimi ekzojen kaynaklı da olabilmektedir. Çevresel ajanlardan genotoksik olmayan karsinojenler doğrudan veya dolaylı olarak hücrede ROS üretirler. Çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmayı takiben oksidatif stres ve hasar meydana geldiği gözlenmiştir. Bu maddelerin içinde klorlu bileşikler, metal iyonlarını (redoks veya redoks olmayan), radyasyonu ve barbitüratları sayabiliriz. Örneğin 2-bütoksietanol'ün dolaylı olarak ROS ürettiği bilinmektedir ve farelerde kansere neden olmaktadır<sup>13</sup>.

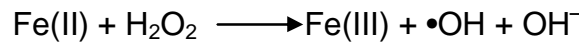
#### ROS'un Kimya ve Biyokimyası:

Süperoksit radikal iyonu polipeptitler, şekerler ve nükleik asitlerle doğrudan reaksiyona girmezken, lipitlerle olan reaksiyonları tartışma konusudur. Süperoksit radikali aşağıdaki reaksiyon ile mutasyon olmadan ortamdaki uzaklaştırılır<sup>14</sup>:

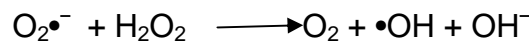


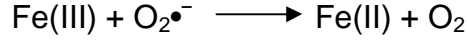
SOD enzimi bu reaksiyonu biyolojik sistemlerde 4 katına kadar hızlandırır. Ancak SOD bu reaksiyonu gerçekleştirirken katalaz (CAT) ve GPx gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi temizleyen enzimlerle birlikte çalışır<sup>15</sup>.

Pek çok serbest radikalın oluşumu redoks-aktif metallerin katılımı ile yakından bağlantılıdır<sup>16</sup>. Hücre redoks durumundayken demir (bazen de bakır) redoks çiftleri ile büyük ölçüde bağlantılıdır ve bu durumu fizyolojik limitler dahilinde korur. Normal şartlar altında hücre içerisinde serbest demir bulunmaz. Fakat stres altında aşırı süperoksit salınımı demir içeren moleküllerden serbest demir açığa çıkmasına neden olur<sup>17</sup>. Açığa çıkan Fe(II) Fenton reaksiyonuna katılır ve çok reaktif olan hidroksil radikalini oluşturur.



Süperoksit radikali, Fe(III)'ün süperoksit tarafından indirgendiği ve oksijen ile Fe(II) meydana geldiği Fenton reaksiyonu ile kombine olan Haber-Weiss reaksiyonuna katılır<sup>18</sup>.



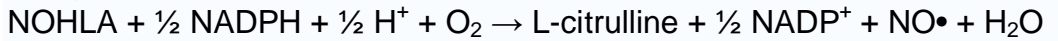
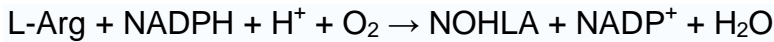


Hidroksil radikali çok reaktiftir ve sulu ortamlardaki yarı ömrü 1 ns'den daha azdır<sup>19</sup>. Bu nedenle oluştuktan sonra yakın olduğu substratlarla reaksiyona girer. Hidroksil radikali değişik mekanizmalarla oluşabilir. Su molekülü (H<sub>2</sub>O) iyonize radyasyon ile parçalanır ve •OH ve hidrojen atomu oluşur. •OH aynı zamanda alkilhidroperoksitlerin fotolitik parçalanması ile de oluşur. DNA'ya yakın olan •OH radikalleri DNA bazları veya deoksiribozil iskeleti ile reaksiyona girebilir. Bu şekilde bazlara veya DNA zincirine hasar verir. •OH tarafından oluşturulan DNA kırığının büyüklüğü yine DNA üzerinde bulunan ulaşılabilir hidrojen atomlarının alanı ile ilintilidir.

Canlı sistemlerde oksijenden oluşan radikallere başka bir örnekte peroksil radikalidir (ROO•). Peroksil radikali içerdiği R grubuna bağlı olarak yüksek enerjili bir radikaldir, redoks potansiyeli +0,77 ile +1,44 arasındadır<sup>20</sup>. Bu tip moleküllerin kimyası içeriğindeki R grubuna, bulunduğu çevreye, oksijen konsantrasyonuna ve diğer reaktanların varlığına göre değişkenlik göstermektedir<sup>21</sup>. Peroksil radikali DNA ayrılması ve protein iskeletinin modifikasyonu olaylarına da karışmaktadır. Peroksil radikali süperoksit tarafından oluşturulan DNA hasarının indüklenmesini artırarak onunla birlikte çalışır.

#### RNS'nin Kimya ve Biyokimyası:

Nitrik oksit (NO•) çok yönlü bir reaktif radikaldir. Nörotransmisyon, kan basıncı düzenlenmesi, savunma mekanizması, düz kas gevşemesi ve immun regülasyon gibi pek çok biyolojik süreçte önemli bir oksidatif biyolojik sinyal moleküldür<sup>22-25</sup>. NO• biyolojik dokularda spesifik nitrik oksit sentaz (NOSs) enzimi tarafından üretilir. NOS, beş elektronluk yükseltgenme reaksiyonu ile L-arginin'den L-sitrulin ve NO• oluşturur<sup>26,27</sup>.

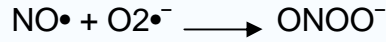


Reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretimine nitrosatif stres denir<sup>28</sup>. Nitrosatif stres, nitrosilasyon reaksiyonlarına neden olur ve protein yapılarında değişiklikler meydana gelir. Bu sebeple proteinler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.

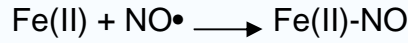
NO• yarılanma ömrü sulu çözeltilerde sadece birkaç saniyedir<sup>29</sup>. Ortamda düşük konsantrasyonda oksijen varsa NO• daha uzun süre istikrarlı kalabilir (yarılanma süresi > 15 sn). Bununla birlikte sulu ortamda ve lipit içerisinde çözünebilir ve kolaylıkla sitoplazma ve plazma membranına difüze olabilir. NO• santral sinir sisteminde nöronal

iletim üzerinde etkilidir. Hücrelerarası boşlukta NO• oksijen ve su ile reaksiyona girerek nitrat ve nitrit anyonlarına dönüşür.

İmmun sistem hücreleri, inflamatuvar sürecin oksidatif yanma ile tetiklenmesi sırasında hem süperoksit anyonu hem de nitrik oksit üretir. Bu şartlar altında süperoksit ve nitrik oksit anyonu birlikte reaksiyona girerek daha oksidatif aktif bir molekül olan peroksinitrit anyonu (ONOO<sup>-</sup>) oluştururlar. ONOO<sup>-</sup>, DNA ayrışmasına ve lipit oksidasyonuna sebep olabilir<sup>30</sup>:



Nitrik oksit bazı geçiş metal iyonlarına kolaylıkla bağlanabilir. NO• fizyolojik etkilerinin çoğunu guanilat siklaz enziminin Fe(II)-hem grubuna bağlanması sonucunda gösterir.



Nitrik oksit pek çok radikalle hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Buna tirozin radikalini örnek verebiliriz. Buna karşılık pek çok radikal olmayan bileşiklerle reaksiyon vermez.

## 2.2 Metal İndükleyici Oksidatif Stres

Pek çok çalışma metallerin toksik ve kanserojen olduğunu, biyolojik sistemlerde reaktif oksijen ve nitrojen türlerin oluşmasında rolü bulunduğunu söylemektedir<sup>16,31-36</sup>. Metal aracılıklı serbest radikal oluşumu DNA bazlarında çeşitli modifikasyonlara, lipit peroksidasyonunda artışa, kalsiyum ve sülfidril homeostazına neden olabilir.

### Demir:

Hayvansal ve insan kaynaklı yapılan çalışmalardaki bilgiler göstermiştir ki; vücuttaki demir oranının yüksek olması ile vasküler hastalıklar, kanser ve bazı nörolojik hastalıkların görülme olasılığının artması arasında ilişki vardır<sup>37,38</sup>. Demirin normal fonksiyonlarındaki aşırı artış (dokulara oksijen taşıması) sonucu demir aracılıklı ROS oluşur. Bu da DNA ile lipit hasarına neden olur. Demirin indüklemesi sonucu oluşan DNA hasarı kanser gelişmesinde önemlidir ve kanser hücrelerinin demire yanıt olarak hızlı geliştiği bilinmektedir<sup>39</sup>.

### Bakır:

Bakır bazı endojen antioksidan enzimler için esansiyel bir bileşendir. Diyetle alınan bakır seviyesinin kanser gelişimine etkileri çeşitli çalışmalara konu olmuştur<sup>40</sup>. İn vivo ve in vitro çalışmalar göstermiştir ki bakır (bakır tuzları) genotoksik değildir<sup>41</sup>. Fakat yüksek bakır içeren çevrede bulunan tümörün kolayca geliştiğini gösteren in vitro çalışmalar vardır<sup>42,43</sup>.

### Krom:

Krom (III) doğada bulunur ve kan glukozunun düzenlenmesinde rol alan önemli bir esansiyel elementtir. Krom (VI) ise yüksek dozda toksik ve karsinojenik olma potansiyelindedir<sup>44-46</sup>. Yalnız krom (VI) in vitro DNA veya izole edilmiş nükleus ile doğrudan reaksiyona girmez. Fakat hücre içerisine girdiğinde (hücre sel indirgeyicilerin varlığında) krom-DNA birleşmesi, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağları ve oksidatif hasara neden olur<sup>16</sup>.

### Kobalt:

Kobaltın kalp için toksik olduğu bilinmekte ve yüksek miktarlarda verildiğinde hayvanlarda karsinojenik olduğundan şüphelenilmektedir. Kobalt sülfat teneffüs eden rat ve farelerde alveolar/bronşiyal neoplazm ve inflamasyon spektrumu, solunum alanlarında fibrotik ve proliferatif lezyonların görülme sıklığı artmıştır<sup>47</sup>. Co(II) enjekte edilen ratlarda, Fenton reaksiyonu yolu ile oluşan hidroksil radikali oksidatif DNA baz hasarına neden olur<sup>48</sup>. Ayrıca kobalt'ın DNA tamir sürecine engel olduğu bulunmuştur<sup>49</sup>. Fakat eser miktarda kobalt diyetle alınmak zorundadır çünkü vitamin B12 yapısında bulunur<sup>50</sup>.

### Vanadyum:

Vanadyum geçiş metal elementidir, çeşitli oksidatif durumlarda meydana gelir ve serbest radikal oluşum reaksiyonlarının içerisinde yer alır<sup>51</sup>.

### Kadmiyum:

Kadmiyum oldukça toksik bir metaldir. Tek başına doğrudan serbest radikal oluşturmaz fakat dolaylı olarak süperoksit radikali, hidroksil radikali ve nitrik oksit oluşturduğu rapor edilmiştir<sup>52</sup>. Bazı çalışmalarda hidrojen peroksit (nonradikal) oluşturduğu bulunmuştur ve hidrojen peroksitte Fenton reaksiyonu yoluyla önemli bir radikal kaynağıdır<sup>53</sup>.

### Arsenik:

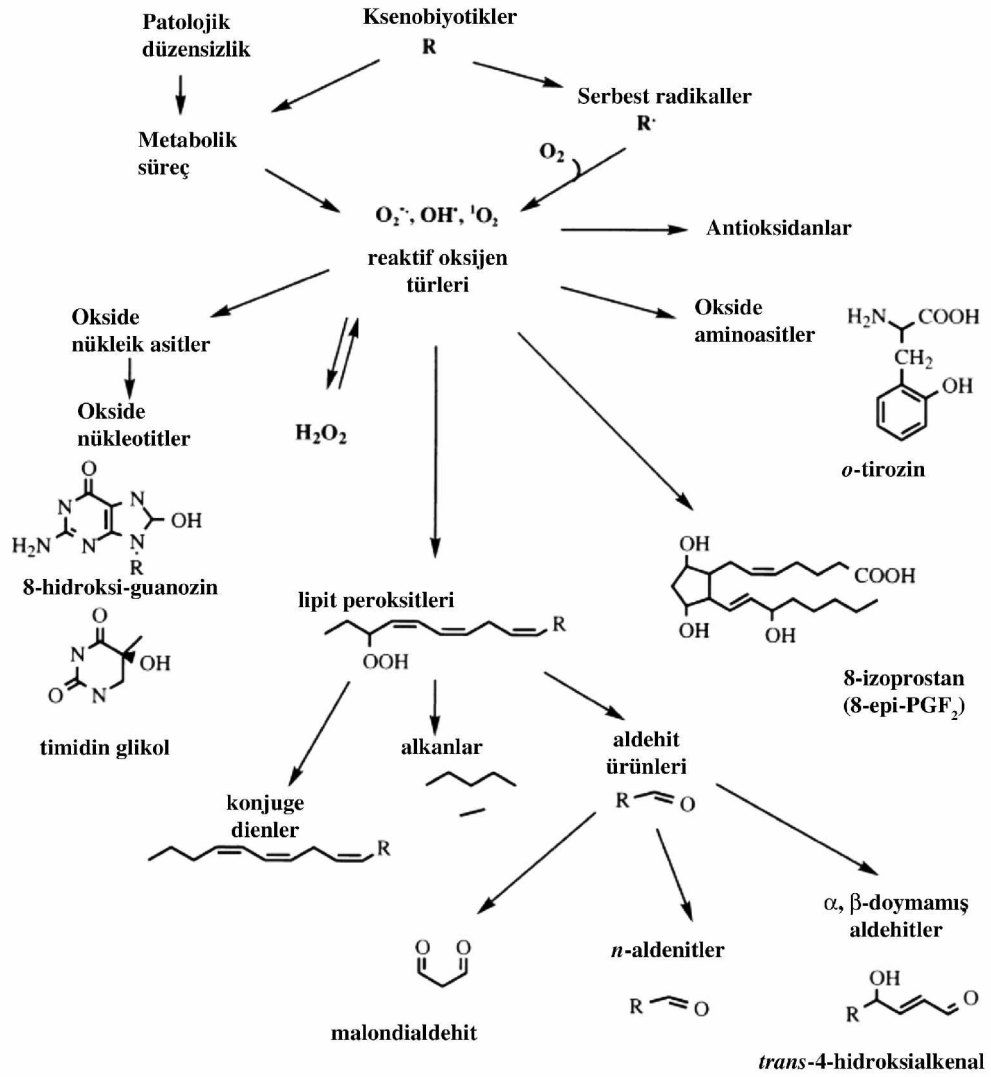
Arsenik (arsenik trioksit,  $As_2O_3$ ) iyi bilinen bir zehir ve insanlar için kanserojen olduğu ispatlanmış bir maddedir. Pek çok çalışma arseniğin hücre içi metabolizması sırasında serbest radikal oluşturduğunu göstermiştir. Arsenik aracılı ROS oluşumu karışık bir süreçtir ve süperoksit ( $O_2\bullet$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), peroksil radikali ( $ROO\bullet$ ), nitrik oksit ( $NO\bullet$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), dimetilarsinik peroksil radikali ( $[(CH_3)_2AsOO\bullet]$ ) ve dimetilarsinik radikali ( $(CH_3)_2As\bullet$ ) gibi değişik ROS oluşumlarını içine almaktadır<sup>54</sup>.

### Nikel:

İnsan için kanserojen bir maddedir ve bunu mutajenik mekanizmalardan daha ziyade DNA metilasyonu ve sıkışmasını artırma

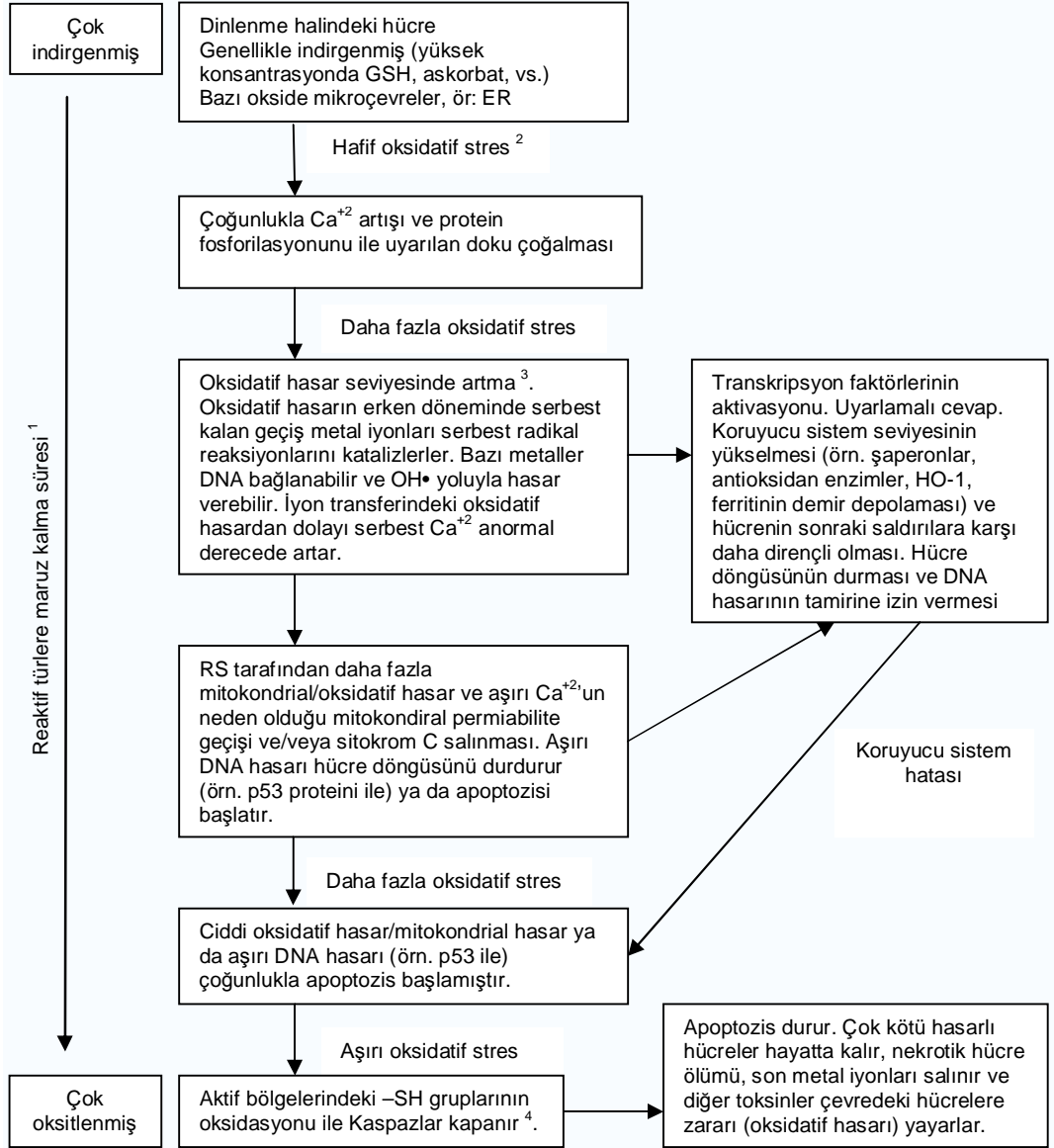
yoluyla gen ekspresyonunu değiştirerek yapar<sup>55</sup>. Çözülemeyen nikel sülfat tozları ve nikel oksitler, nikel karbonil buharı ile çözülebilen aerosoller olan nikel sülfat, nitrat ve klorit potensiyel karsinojen olan nikel bileşikleridir<sup>56</sup>.

Serbest radikal hasarı ürünleri Şekil 1'de, reaktif türlere maruz kalma süresine göre hücresel cevap Şekil 2'de gösterilmiştir.



**Şekil 1: Serbest radikal hasarı ürünleri**<sup>57</sup>. Serbest radikaller çeşitli makro moleküllerle (örn: DNA, hücre membranları, proteinler) reaksiyona girerler ve sonunda pek çok farklı moleküllerin oluşmasına neden olurlar.





**Şekil 2: Reaktif türlere maruz kalma süresine göre hüresel cevap<sup>58</sup>.** Düşük seviyedeki reaktif türlerin stimüle ettiği çoğalma ile çoklu protein fosforilasyonunun artması arasında bir ilişki vardır. Çünkü reaktif türler, protein fosfataz enzimlerini inaktive eder<sup>59</sup> ve bazen de protein kinaz aktivitesini artırır<sup>60</sup>. Hücre genellikle indirgenmiş bir ortamda bulunur, özellikle mitokondri GSH/GSSG>100 ve sitozol GSH/GSSG>100'dür. Fakat endoplazmik retikulum lümeni daha oksidedir GSH/GSSG≈3. Çünkü protein katlanmaları ve disülfid köprülerinin oluşabilmesi için okside bir çevreye ihtiyaç vardır. <sup>1</sup> Reaktif tür ortak bir terimdir ve reaktif oksijen, nitrojen, halojen ve sülfür türlerini içerir. ROS oksijen merkezli radikalleri (hidroksil, süperoksit, peroksit vb) ve bazı radikal olmayan oksitleyici ajanları ve/veya kolaylıkla radikale dönüşebilenleri (peroksinitrit, hipokloröz asit vb) içerir. RNS nitrik oksit, nitrojen dioksit radikalleri ve radikal olmayan nitrojen klorit ile nitroksil anyonu'nu barındırır. Birçok reaktif tür (hepsi değil) güçlü oksitleyici ajanlardır, DNA ve diğer biyomoleküllere hasar verebilirler. <sup>2</sup> Oksidatif stres antioksidanlar ile reaktif türlerin seviyesi arasındaki dengenin reaktif tür lehine bozulmasıdır ve ciddi hasarlara sebep olur. <sup>3</sup> Reaktif türün doğrudan saldırısı sonucu biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşur. Bu durum, hücredeki hasar oranı ile tamir ve hasarlı biyomoleküllerin yerine konulması oranı arasında denge ile kontrol edilir. <sup>4</sup> Kaspaz aktivitesi, reaktif tür tarafından etkilenen hücre içi pH değişimleri ile kontrol edilebilir<sup>61,62</sup>.

## 2.3 Biyomoleküllerin Oksidatif Hasarı

### 2.3.1 Lipit Peroksidasyonu

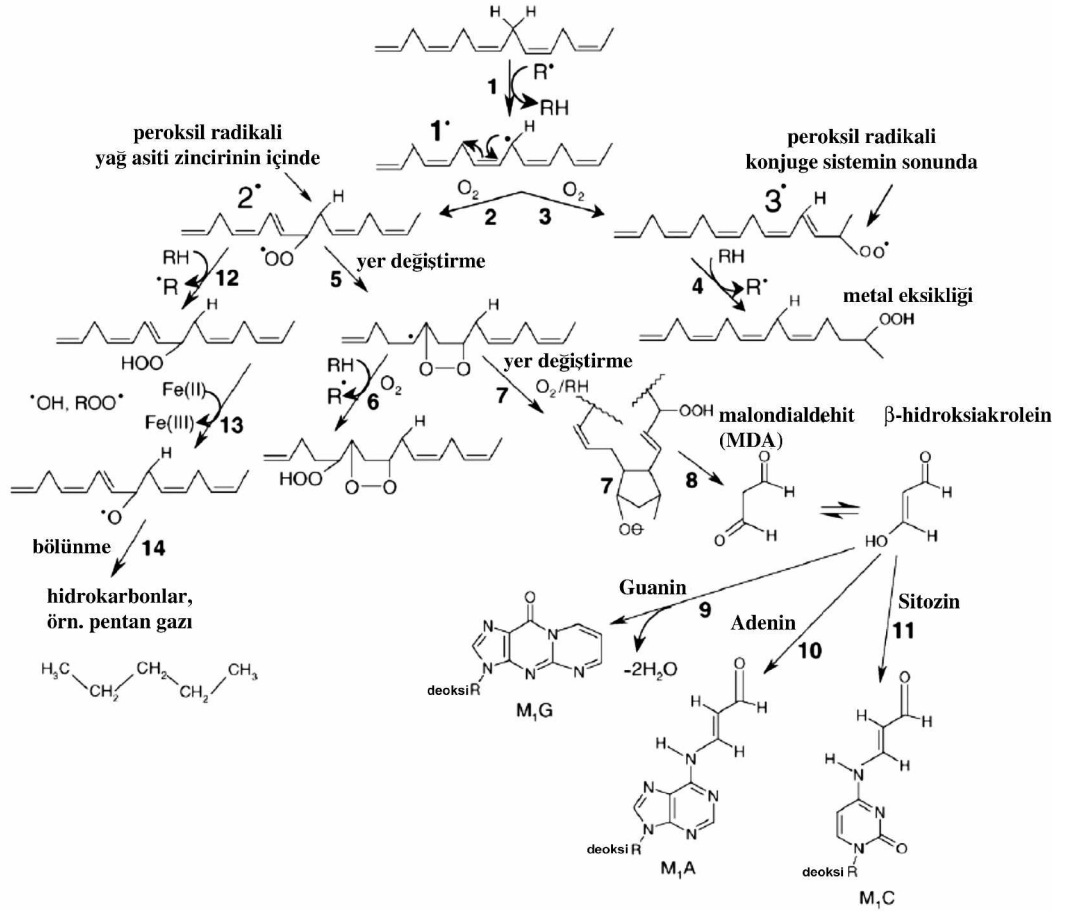
Serbest radikaller hücre içerisinde DNA, protein ve hücre membranı gibi değişik moleküllere zarar verir ve lipit peroksidasyonu tüm bu zarar gören moleküller içinde belki de en fazla araştırılan süreçtir. Membran fosfolipidlerinin çok olduğu alanlar radikallere, özellikle ROS'a karşı hassastır. Radikaller bu noktalardan hücre içi hedeflerine kolaylıkla ulaşabilirler ve orada oksidatif hasara neden olurlar. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) serbest radikal reaksiyonlarına karşı çok dayanıksızdır<sup>63,64</sup>. Yağ asitlerindeki lipit peroksidasyonu radikal zincir reaksiyonuna neden olur.

Lipit peroksidasyon süreci üç aşamadan oluşur: başlangıç, çoğalma ve sonlanma (Şekil 3)<sup>65,66</sup>. Zincir içi yer değiştirme reaksiyonları ile hidroksil radikalleri yeniden düzenlenebilirler. Bu yolla peroksidasyon sürecinin son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) oluşur (Şekil 3)<sup>64</sup>. Lipit peroksidasyonun bir diğer önemli son ürünü ise 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE)'dir (Şekil 3). MDA, bakteri ve memeli hücreleri için mutajenik iken ratlar için karsinojeniktir. MDA, DNA bazları G, A ve C ile reaksiyona girerek M<sub>1</sub>G, M<sub>1</sub>A ve M<sub>1</sub>C oluşturur (Şekil 3). 4-HNE ise daha az mutajenik olmasına rağmen daha toksik bir üründür. Ayrıca 4-HNE'nin sinyal yollarına çok güçlü etkileri vardır. Lipit peroksidasyonu otokatalitik bir süreçtir ve sonlanması için radikallerin birleşmesi ( $R\bullet + R\bullet \rightarrow$  radikal olmayan ürün) veya ortamdaki substratın tükenmesi gerekir<sup>64,67</sup>.

### 2.3.2 Protein Oksidasyonu

Amino asit yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonu, reaktif oksijen aracılı peptid ayrılmaları ve lipit ve karbonhidrat oksidasyon ürünleri ile reaksiyon sonucu protein oksidasyon ürünleri ile protein karbonil türevleri oluşabilir. Proteinlerdeki tüm aminoasit rezidülerinin yan zincirleri iyonize radyasyon ve ROS/RNS ile oluşan oksidasyondan çok çabuk etkilenirler. Değişik ROS ve RNS ile etkilenme sonucu bazı aminoasit rezidülerinde şu değişiklikler meydana gelebilir<sup>68</sup>:

- Arjinin  $\rightarrow$  Glutamik semialdehit,
- Glutamat  $\rightarrow$  4-hidroksi-glutamat,
- Histidin  $\rightarrow$  2-oxo-histidin,
- Tirozin  $\rightarrow$  3,4-dihidroksi fenilalanin, tyr-tyr çapraz bağı, 3-nitrotirozin,
- Valin  $\rightarrow$  3,4-dihidroksi valin,
- Sistein  $\rightarrow$  cys-S-S-cys, cys-S-S-R disülfid
- Prolin  $\rightarrow$  Glutamik semialdehit, 2-pyrrolidone-4-hidroksi prolin
- Methionin  $\rightarrow$  methionin sülfon ve sülfoksit.



**Şekil 3: Lipit peroksidasyonunda çeşitli yollar<sup>67</sup>.** Çoklu doymamış yağ asidindeki metilen grupları oksidasyondan çok çabuk etkilenirler. Yapıdaki hidrojen atomları radikal (R•) ile etkileşime girer ve yapıdan ayrılarak karbon merkezli radikal 1• oluşur (Reaksiyon 1). Karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturur (Reaksiyon 2 ve 3). Peroksil radikal çift bağın sonunda bulunuyorsa (3•) hidroperoksite indirgenir ve bu molekül metal yokluğunda nispeten daha stabildir (Reaksiyon 4). Peroksil radikal zincir içerisinde yer alırsa (2•) yer değiştirme reaksiyonu ile bitişğinde siklik yapıda yeni bir karbon merkezli radikal oluşturur (Reaksiyon 5). Bu yapı ya bir basamak daha indirgenerek hidroperoksite dönüşür (Reaksiyon 6) ya da ikinci bir yer değiştirme reaksiyonu ile bisiklik peroksit dönüşür (Reaksiyon 7). Bu malondialdehite (MDA) dönüşmeden önce oluşan ara bir moleküldür (Reaksiyon 8). MDA DNA bazları G, A ve C ile reaksiyona girebilir (Reaksiyon 9-11). Peroksil radikal zincir içerisinde yer alan yapı (2•) yer değiştirme reaksiyonundan başka komşu yağ asidi molekülünden hidrojen alarak lipit hidroperoksiti oluşturabilir (Reaksiyon 12). Daha sonra redoks metallere reaksiyona girerek alkoksil radikal (RO•) (Reaksiyon 13) ve sonrasında ayrılarak gaz halinde pentan oluşabilir (Reaksiyon 14). Pentan lipit peroksidasyonu için iyi bir belirteçtir.

Bundan başka proteinlerin prolin, histidin, arjinin, lizin ve sistein rezidüleri redoks metallere oksidasyona çok hassastırlar<sup>67</sup>.

Protein karbonil grupları pek çok değişik mekanizma ile oluşmaktadır ve gelişen teknoloji ile yüksek hassaslıkta ölçümler

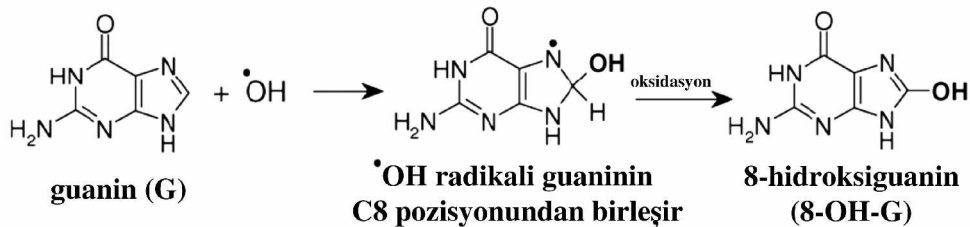
yapılabilmektedir. Protein karbonil grupları konsantrasyonu ROS aracılı protein oksidasyonu için iyi bir belirteçtir ve romatoid artrit<sup>69</sup>, Alzheimer<sup>70</sup>, solunum yetmezliği<sup>71</sup>, Parkinson<sup>72</sup> ve ateroskleroz<sup>73</sup> gibi hastalıklarda arttığı gözlenmiştir.

Protein oksidasyonu ile yaşa bağlı hastalıklar ve yaşlanma arasında ilişki olduğunu gösteren başka çalışmalar da vardır<sup>74,75</sup>. Hayvan çalışmalarına göre yaşlanma sürecince proteinlerin okside formlarının birikmesi söz konusudur. Bu birikim çeşitli sebeplerle olabilir; (i) kararlı (steady-state) durumunda ROS/RNS düzeylerinin artması ve/veya organizmada antioksidan kapasitenin azalması; (ii) proteaz konsantrasyonunun azalması ve/veya proteaz inhibitörlerinin artmasına bağlı olarak okside proteinlerin parçalanma kapasitesinin azalması<sup>67</sup>.

### 2.3.3 DNA Hasarı

ROS hücredeki hemen hemen bütün yapı ve molekülleri etkiler. Fakat DNA ana hedefidir, bu sebeple de yaşlanma ve kanser ile ilgilidir<sup>76</sup>. ROS; tek veya çift zincir DNA kırığına, pürin ve pirimidinlerde modifikasyonlara, deoksiriboz-fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlantılarına neden olabilir. DNA hasarı transkripsiyonun indüklenmesi veya durması, sinyal yollarının indüklenmesi, replikasyon hataları ve genomik instabilite ile sonuçlanır. Bütün bunlar da karsinogenez ile ilişkilidir<sup>77-80</sup>.

Oksidatif baz modifikasyonları mutasyon ile sonuçlanabilir. Halbuki deoksiriboz parçalarının oksidasyonu baz salınmasına ve DNA zincir kırığına sebep olabilir<sup>81-83</sup>. Singlet oksijen guanini kolayca oksitleyebilir ve guanin DNA'daki en kolay oksitlenebilen bazdır<sup>84-86</sup>. Hidroksil radikalının DNA molekülünün bütün bileşenleri ile reaksiyona girdiği bilinir: pürin, pirimidin bazlarına ve deoksiriboz iskeletine hasar verir<sup>87</sup>. Hidroksil radikali dört bazdan birçok ürün oluşturabilir, ör. 5-hidroksimetilurasil, 8-hidroksiadenin, timidin glikol vb<sup>77</sup>, ancak guanine belli pozisyonlardan saldırır<sup>88</sup> (Şekil 4).

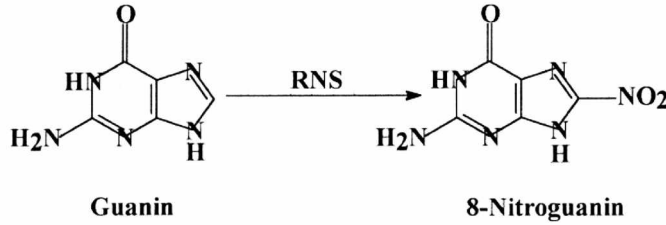


Şekil 4: Guanin'in hidroksil radikali ile reaksiyonu<sup>67</sup>

8-OH-G insan idrarında bulunduğu ilk kez Ames ve ark. tarafından gösterilmiştir<sup>89</sup>. Bu okside DNA ürünü önemlidir çünkü hem

mutajenik hem de karsinojenik forma kolaylıkla dönüşebilir. Organizmadaki oksidatif stres için iyi bir belirteçtir, karsinogenez için ise potansiyel bir belirteçtir. 8-hidroksiguanin keto-enol tautomerizme uğrar ve bu nedenle de birkaç isimle anılır. Bunlar 8-hidroksiguanin (8-OH-G) ve 8-oxoguanine (8-oxoG)'dir. Normal bir hücrede bu baz modifikasyonu yaklaşık olarak  $10^5$  guanin bazından birinde meydana gelir. Hem idrarda hem de lökositlerde iyonize radyasyon, karsinojenik ve ekzojen kaynaklı ROS'a bağlı oksidatif DNA hasarına bağlı olarak görülebilir<sup>1</sup>. Sigara, diğer ROS kaynaklı karsinojenler oksidatif DNA hasarını artırırlar ve idrarla 8-oxo-G atılımı %35-50, lökositteki oranı ise %20-50 oranında artar<sup>67</sup>.

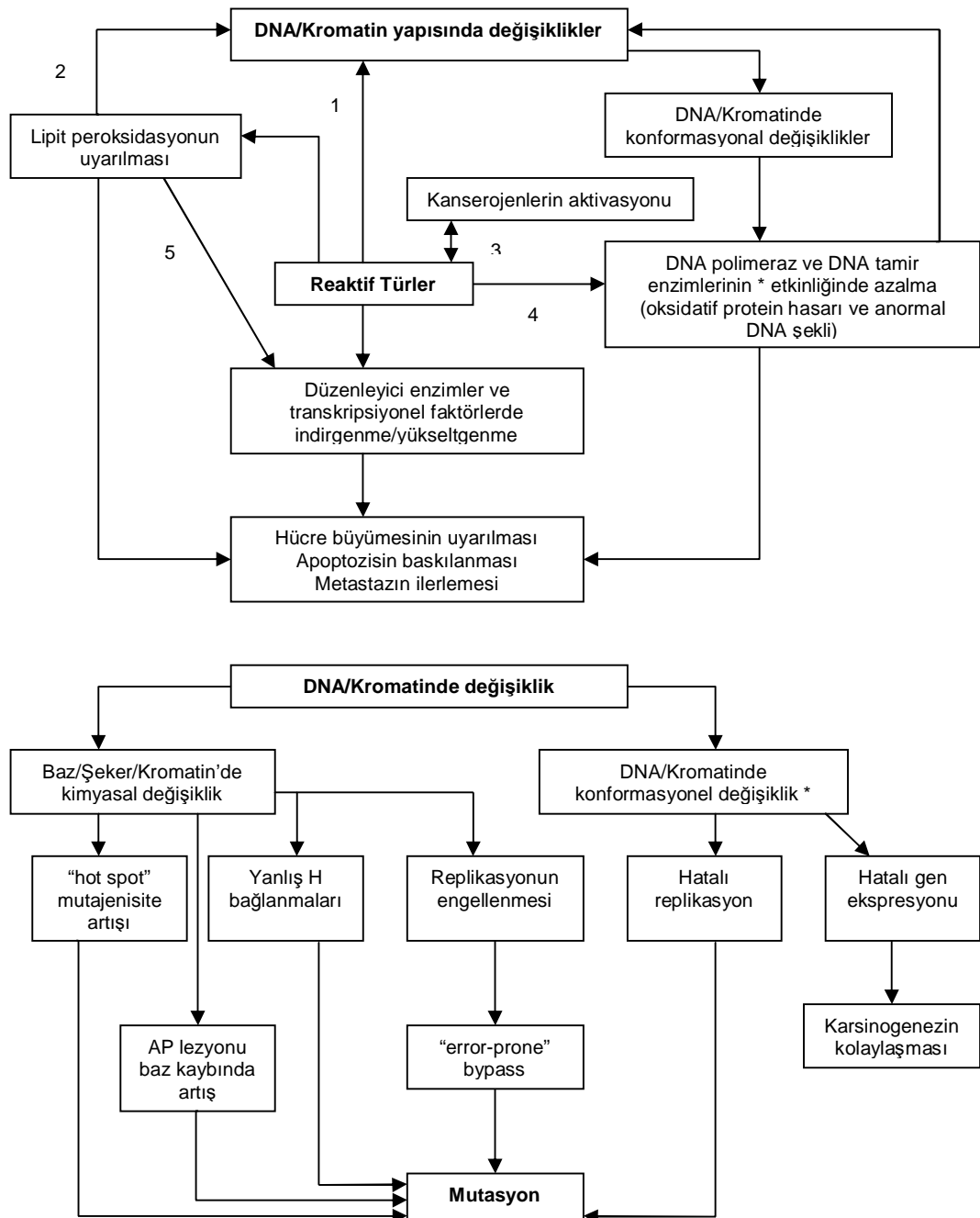
ROS'tan başka reaktif nitrojen, klorin, bromin ve sülfür türleri de DNA'ya saldırarak hasar yapabilirler<sup>90,91</sup>. RNS, örn. peroksinitrit ve nitrojen oksit DNA hasarı yapabilirler<sup>92</sup>. Peroksinitrit guanin ile reaksiyonu sonucu 8-nitroguanin oluşturur (Şekil 5). Bu yapıdan dolayı G:C →T:A ile yer değiştirebilir. DNA'da bu lezyonun stabilitesi kısa sürelidir ancak RNA'da bu nitrojen bağlanması stabildir. 8-nitroguanin ile karsinogenez süreci arasındaki bağlantı tam olarak bilinmemektedir<sup>67</sup>. Reaktif klorin türleri klorinat sitozin ve adenin olabilirler<sup>90</sup>. Reaktif türler protein ve lipitleri etkileyerek DNA hasarını daha da kötüleştirebilirler (Şekil 6).



**Şekil 5: Guanin'in RNS ile reaksiyonu**<sup>93</sup>

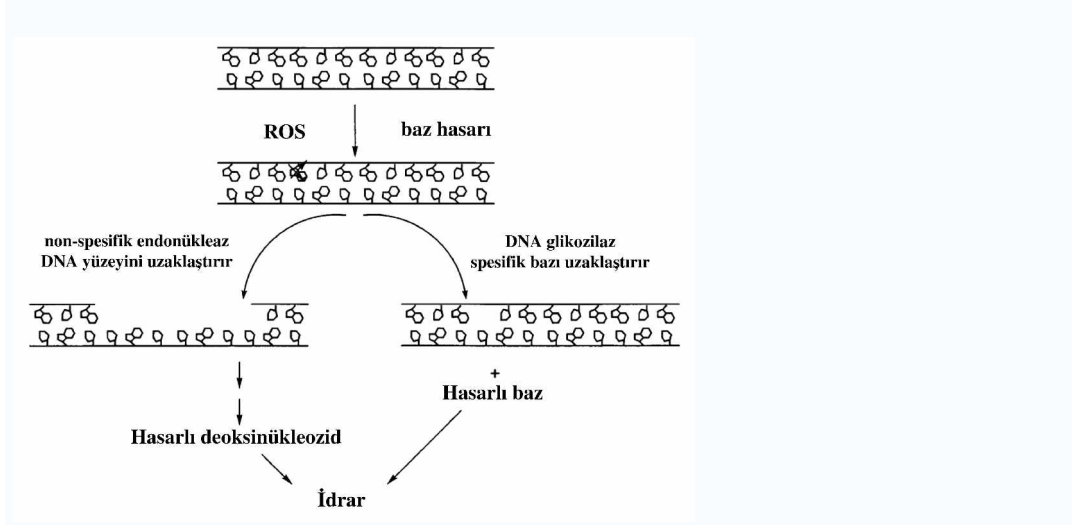
Hasar görmüş DNA endonükleaz ve glikozilazlarca deoksinükleotid ve bazların uzaklaştırılması ile tamir edilebilir (Şekil 7). Bazlar doğrudan idrarla atılırken, deoksinükleotitler mono-nükleozitlere metabolize olduktan sonra idrarla atılır<sup>89,94</sup>.

Bunlara ek olarak mitokondrial DNA (mtDNA)'nın oksidatif hasarı karsinogenez sürecinin de içinde bulunduğu çeşitli hastalıklarda önemli rol oynayabilir<sup>8</sup>. Kompleks I, III, IV ve V'e ait mitokondrial genlerin deşifre edilmesi sırasındaki değişiklikler ve mutasyonlar, mitokondrial DNA üzerindeki değişiklikler çeşitli kanserlerde tespit edilmiştir. Mitokondrial DNA'nın nükleer DNA'dan daha fazla oksidasyona uğramasını şöyle açıklayabiliriz<sup>8</sup>: (i) mitokondri fizyolojik şartlarda oksijenin ~ %5'ini süperoksit anyonuna ve sonrasında da hidrojen perokside dönüştürür; (ii) mtDNA'nın tamir kapasitesi sınırlıdır, bu nedenle hasarlı nükleotid tamamen çıkartılamaz; (iii) mtDNA histonlar tarafından korunmaz.



**Şekil 6: Reaktif türlerin kanser gelişimini kolaylaştırmasını gösteren bazı yollar<sup>58</sup>.**

Üstteki şekil: 1.Doğrudan DNA'da oksidatif hasar. 2.Lipit peroksidasyonu son ürünlerinin (ör. MDA, 4-HNE) DNA bazlarına mutajenik bağlanması. Radikallerde (RO• ve RO<sub>2</sub>•) lipit peroksidasyonu süresince DNA'ya saldırıda bulunur. 3.Reaktif türler pro-kanserojenlerin, DNA bazları ve fosfat grupları ile kovalen bağ yapabilmeyen “ultimate kanserojen”e dönüşmesine yardımcı olabilir. Bazıları ise daha güçlü reaktif türlerin oluşmasına neden olabilir. 4.Reaktif türler kromatin proteinleri, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar gibi proteinlerin hasarına neden olabilir ve bu durum replikasyon hatası görülme oranını arttırabilir. 5.4-HNE pro-proliferatiftir ve güçlü bir redoks modülatördür<sup>95</sup> ve bazı diğer lipit peroksidasyon ürünleri de benzer etki gösterebilir<sup>90</sup>. Altındaki şekil: Reaktif türlerin aracılık ettiği DNA değişimi nasıl mutasyona neden olabilir? \*Başka muhtemel bir mekanizma ise (burada gösterilmemiştir) reaktif türler gen metilasyonunu etkileyebilir.



**Şekil 7: Nonspesifik endonükleazlar ve spesifik glikozilazlarca DNA hasarının tamiri**<sup>78</sup>

DNA'nın doğrudan kimyasal modifikasyonu reaktif oksijen / nitrojen / klorin türlerinin zarar verme yollarından sadece biridir ve bu durum mutasyonlara ve karsinojenik durumların ilerlemesine neden olabilir<sup>96-98</sup>. Bazı reaktif türler (ör.  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ) düşük düzeylerde hücre çoğalmasını stimüle ederken yüksek düzeylerde bunu durdurmaktadır<sup>99</sup>. Reaktif türlerin indüklediği lipit peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünler (ör. MDA ve doymamış aldehytlar) DNA'ya bağlanarak mutajenik lezyonlar oluşturabilirler<sup>100-102</sup>. DNA polimerazlar<sup>98,103</sup> ve tamir enzimleri<sup>97</sup> reaktif türler tarafından hasara uğratılabilir, replikasyonun doğruluğu azalabilir ve lezyonların tamiri yavaşlayabilir.

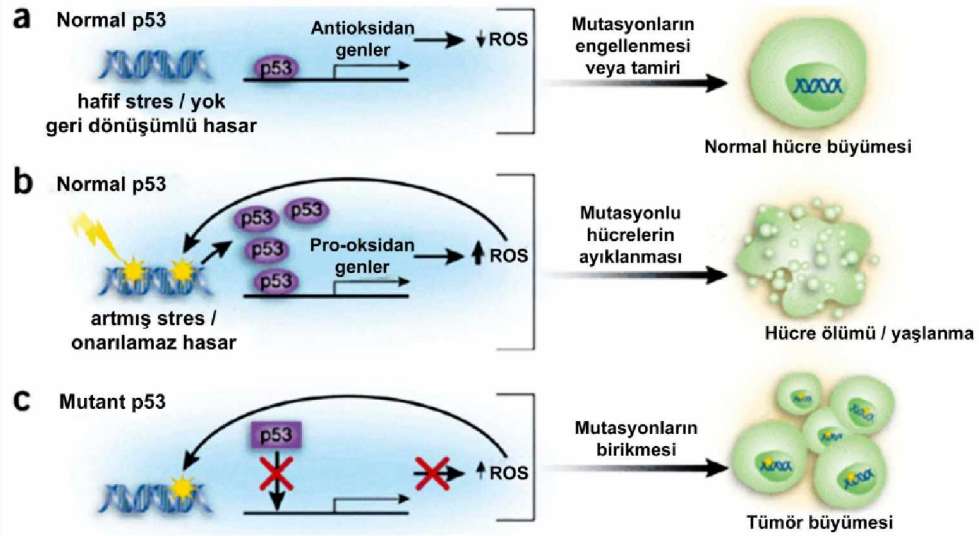
**Tablo 2: Oksidatif hasar tamiri**<sup>104</sup>

Hasar gören yapı	Tamir sistemi
DNA OH• DNA'nın bütün bileşenlerine saldırırken singlet $O_2$ guanin'i tercih eder. $H_2O_2$ ve $O_2$ DNA'ya saldırımazlar.	DNA ligaz, 8-hidroksideoksiguanozin glikozilaz ve apuritik/apirimidinik endonükleazlar gibi pek çok enzim DNA'daki anormallikleri fark eder ve onları çıkararak uzaklaştırır, tekrar sentezler ve DNA zincirine tekrar dahil eder.
Proteinler Birçok ROS –SH gruplarını okside edebilir. •OH radikali birçok aminoasit rezidüsüne saldırır. Proteinler çoğunlukla geçiş metal iyonları ile bağlanarak, •OH radikalının hedefi haline gelirler.	Okside metionin rezidüleri metionin sülfoksit redüktaz enzimi ile tamir edilir. Okside proteinler belirlendikten sonra hücrel proteazlarca yıkılır.
Lipitler Bazı reaktif oksijen türleri ( $O_2$ ve $H_2O_2$ dahil değil) lipit peroksidasyonunu başlatabilir.	Zincir kırıcı antioksidanlar (özellikle alfa-tokoferol) zincir uzatıcı peroksil radikallerini uzaklaştırırlar. Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz ve bazı fosfolipazlar membrandan peroksitleri uzaklaştırabilir. Normal membran döngüsü hasarlı lipitleri uzaklaştırabilir.

## 2.4 Oksidatif Stres ve Kanser

### 2.4.1 Reaktif Türler ve Hücre Proliferasyonu

Reaktif türler hücre davranışlarını birçok yolla etkilerler. Reaktif türlerin tipi ve düzeyi, ne kadar süreyle maruz kalındığı, bunları ortadan kaldıracak olan hücrenin antioksidan savunma düzeyi ve oksidatif hasarı düzeltecek olan hücrenin tamir mekanizmasının aktivitesine bağlı olarak hücre bu reaktiflerce değiştirilir. Bunun sonucunda proliferasyonda artış, hücre döngüsünde durma, yaşlılık, apoptozis ve nekroz görülebilir (Şekil 2). Reaktif türler kanserin başlaması, yükselmesi ve ilerlemesi aşamalarına katılır ve böylece bunların etkisiyle hücre döngüsü, gen ekspresyonu, doğrudan veya dolaylı DNA hasarı ve apoptozis ve diğer şekillerde hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 2). Reaktif türlerin düzeyi hücrenin normal proliferasyonundan hücre döngünün durmasına geçişinde (veya hücreye özgü başka olayların başlamasında) “şalter” görevi görür.



**Şekil 8: p53 proteininin pro- ve antioksidan fonksiyonları**<sup>105</sup>

a) Stres olmadığında veya hafif streste, düşük düzeyde p53 bazı genlerin ekspresyonu sağlar. Bunlar antioksidan proteinleri deşifre ederler ve reaktif türlerin düzeyi azalır. p53 DNA tamirini de kolaylaştırır. b) Şiddetli veya süresi uzamış stresten sonra p53 aktivitesinde görülen artış reaktif türlerin çeşitli mekanizmalarca oluşmasına sebep olur. Bunun sonucunda reaktif tür seviyesinde artış olur ve bu durumda yaşlılık veya ölüm sürecine katkıda bulunur. Her iki mekanizma da tümör baskılanmasına katkı sağlar. c) p53 fonksiyonunun kaybolmasından sonra malign tümörde hücre içi reaktif tür seviyeleri artar, DNA hasarı ve mutasyon oranları yükselir. Bu onkogenik değişikliklere karşılık olarak p53'ün indüklediği apoptozisin yetersiz kalması sonucunda kanser gelişir.



### p53 ve Reaktif Türler:

p53'ün kanser ve reaktif türler ile olan yakın ilişkisi şekil 8'de gösterilmiştir<sup>105</sup>. İlk olarak; normal düşük düzeydeki p53 aktivitesi hücrel antioksidan savunmanın sürdürülmesini, okside peroksiredoksinleri rejenere edecek olan MnSOD, GPx1 ve proteinlerin genlerinin transkripsiyonla deşifre edilmesini sağlar. İkinci olarak; reaktif türler p53 aktivitesini arttırabilir. Böylece ras onkogenlerin ekspresyonu  $O_2^{\bullet-}$  üretimini hızlandırabilir ki bu durum bazı durumlarda p53 aktivitesini arttırırken yaşlanmayı tetikleyebilir. Üçüncü olarak; yüksek p53 aktivitesi bazı mekanizmalarla reaktif türlerin üretimine neden olabilir ve bu reaktif türler bazen p53'ün sitostatik ve pro-apoptotik etkilerine katkıda bulunabilir.

Fakat çok fazla okside reaktif türün oluşması p53 aktivitesini inhibe eder. p53 on tane sistein rezidüsü içerir ki proteinin aktif olabilmesi için bunlardan bazılarının çinko iyonu ile bağ yapması gerekir. Sistein'in oksidasyonu p53'ün transkripsiyon faktör etkisini inhibe eder.

#### **2.4.2 Apoptozisin Reaktif Türler ile Düzenlenmesi**

İlımlı düzeydeki reaktif türler ("ılımlı" seviye hücre tipine göre değişebilir) normal hücrelerde apoptozisin ilerlemesine (Şekil 2) veya hücre ölümüne neden olur<sup>106,107</sup>. Fakat bazı malign hücrelerde reaktif türler tam karşı bir etki yapabilirler. Örneğin melanoma M14 hücresinde CuZnSOD'un aşırı ekspresyonu ile düşen  $O_2^{\bullet-}$  apoptozisi ilerletirken CuZnSOD seviyesinin düşmesi ile apoptozis inhibe olur<sup>61</sup>.

Bazen kaspazların oksidatif inaktivasyonu gerçekleşebilir (Şekil 2). Bazı hücrelerde artmış  $O_2^{\bullet-}$  seviyesi sitozolik pH'ın da yükselmesine neden olur ki bu durumda kaspaz aktivitesi engellenir<sup>62</sup>. Buna karşı  $H_2O_2$  sadece DNA'ya saldırarak (geçiş metal iyonları ile reaksiyona girerek dönüştüğü  $O_2^{\bullet-}$  DNA hasarı yapar<sup>90</sup>) değil mitokondri hasarı ve sitozolik pH'ı düşürerek de apoptozisi ilerletebilir.  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin hücre pH'ı üzerindeki arttırma ve azaltma etkileri hücre membranında bulunan  $Na^+/H^+$  sistem ile olabilir<sup>62</sup>. Başka bir mekanizma da ise reaktif türler PTEN'i (fosfataz ve tensin homolog; tümör baskılayıcı gen) inaktive ederler. Bu durum Akt (protein kinaz B; sinyal molekülü) yolunun aktivasyonunu arttırır ki hücrenin hayatta kalmasını sağlar<sup>108</sup>. Fakat Akt sinyal yolunun karsinojenik süreç ile olan ilişkisi karmaşıktır, örneğin bazı çalışmalar göstermiştir ki bu yolun aktivasyonu invazyon ve metastazı baskılayabilir<sup>108</sup>.

#### **2.4.3 Metastaz ve Reaktif Türler**

Reaktif türlerin hücrel etkileri pek çok laboratuvar çalışmasında gösterilmiştir. Peki, gerçekten kanserle ilişkili midir? Bazı

çalışmalara göre invazyon ve metastazla ilişkilidir<sup>109-115</sup>. Reaktif türlerin değişik etki mekanizmalarından biri integrin ekspresyonunu ayarlamak, başka bir tanesi ise “anoikis”i (hücresinin normal çevresi ile ilişkisinin kesilmesi ve apoptozisin başlaması) baskılamaktır. Hücre yüzeyi morfolojisinin değişmesi, hücre içi iletişim, hücre hareketi ve vasküler geçirgenliğin artması metastazın kolaylaşmasını temin eder. Ayrıca ekstraselüler matriks, tümör hücreleri ve fagositler özellikle makrofajlar<sup>116</sup> tarafından salınan matriks metalloproteinazlarca (MMP) bozulur. MMP reaktif türler tarafından aktive edilir<sup>90</sup>. MMP enzimleri serbest kalan büyüme faktörlerinin matriks bileşenleri ile bağlanmasını sağlayabilir. Örneğin MMP3 (stromelysin-1) düzeyi birçok meme tümöründe yükselir. ROS ürünlerinin yükselttiği bu enzime maruz kalan fare meme epitelyum hücrelerinde oksidatif DNA hasarı ve genomik instabilite görülmüştür<sup>114</sup>. İnsan metastatik prostat kanser hücrelerinde primer malign hücreye göre daha fazla reaktif türlerin ürünü varlığı tespit edilmiştir<sup>113</sup>. Ayrıca 8-OHdG, 4-HNE ve 3-nitrotirozin daha yüksektir<sup>117</sup>.

#### 2.4.4 Malign Hücrelerde Pro-Oksidan Durum

Bazı malign hücreler apoptozisi baskılamak, proliferasyonu, metastazı ve anjiyogenezisi arttırmak ve genetik instabiliteyi ilerletebilmek için ROS’u kullanır<sup>61,90,110-115,118-120</sup>. Birçok malign hücre kültüründe yüksek düzeyde ROS üretilmiştir<sup>121</sup>. Fakat hücre kültürlerindeki ROS, kontaminasyonla mı artmış yoksa in vivo da malign hücrelerde ROS yapımı gerçekten fazla mı, tartışma konusudur. Bazı araştırmacılar bu verileri destekler sonuçlar bulmuştur. Örneğin, kronik lenfositik lösemi hücrelerinden yeni alınan örneklerdeki ROS üretimi normal lenfositlerden daha yüksektir<sup>122</sup>. Fakat solid tümörlerde, in vivo reaktif türlerin üretimini arttırdığını göstermek metodolojik yetersizliklerden dolayı zordur<sup>90,123</sup>, bu yüzden pek çok araştırmacı ROS üretimi yerine oksidatif hasar düzeyini incelemiştir. Birçok çalışma insan ve hayvan tümörlerinde 8-OHdG seviyelerinin arttığını göstermiştir<sup>90,124-128</sup>.

Malign hücrelerde oksidatif hasar seviyesinin yükselmesi çeşitli nedenlerle olabilir: (i) reaktif tür oluşumunun artışı ile antioksidan savunmada değişiklik olmaması; (ii) reaktif tür oluşumunda değişiklik olmaması ancak antioksidan savunmada azalma; (iii) hücre düzeyinde oksidatif hasar tamirinde hata olması ve hasarın artması; (iv) yukarıdaki kombinasyonlardan herhangi biri.

#### Reaktif Türlerin Oluşumunda Artış:

Eldeki verilere göre en azından bazı in vivo malign tümörler normal hücrelere göre daha fazla ROS üretmektedir<sup>109,115,120,129,130</sup>. ROS kaynakları içinde lizil oksidaz<sup>129</sup>, prolin oksidaz<sup>131</sup>, mitokondrial  $O_2^{\bullet-}$  oluşumundaki artış ve NADPH oksidaz (NOX) sisteminin oluşturduğu  $O_2^{\bullet-}$

vardır<sup>132</sup>. Örneğin bazı prostat kanserleri mitokondrial DNA mutasyonu içerir ve mitokondrial ROS üretimi artar<sup>133</sup>.

#### DNA Tamir Oranındaki Değişim:

DNA tamirindeki hatalar ve DNA tamir enzimlerindeki olası polimorfizimler bazı kanserlerin başlamasına katkıda bulunur<sup>134</sup>. Ancak bazı kanserlerde ise diğer çalışmalardakinin tersine DNA tamir enzimlerinin aktivitelerinde artış olduğu belirtilmiştir<sup>134-137</sup>. DNA tamiri bazen ileri evre tümörlerde down regüle edilebilir, bu durumda genetik instabiliteyi ve tümör progresyonunu ilerletebilir<sup>134,138,139</sup>.

#### Antioksidan Savunmadaki Değişim:

Kültürdeki tümör hücreleri genellikle düşük MnSOD aktivitesi gösterirler. Transenfekte edilmiş MnSOD geni bu tip hücrelerde (tamamında değil) malign fenotipi baskılayabilir<sup>140,141</sup>. Bazı araştırmacılara göre artmış MnSOD daha fazla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretir ki bu durum da (bazen p53 aktivasyonu ile) proliferasyonun inhibisyonuna neden olur. Buna uygun olarak CAT fazla salgılanması bu hücrelerdeki MnSOD'un aşırı etkilerini engeller<sup>141</sup>. Dönüştürülmüş hücrelerde CuZnSOD, CAT ve GPx1 aktivitelerinin düşük olduğu da rapor edilmiştir<sup>141-143</sup>.

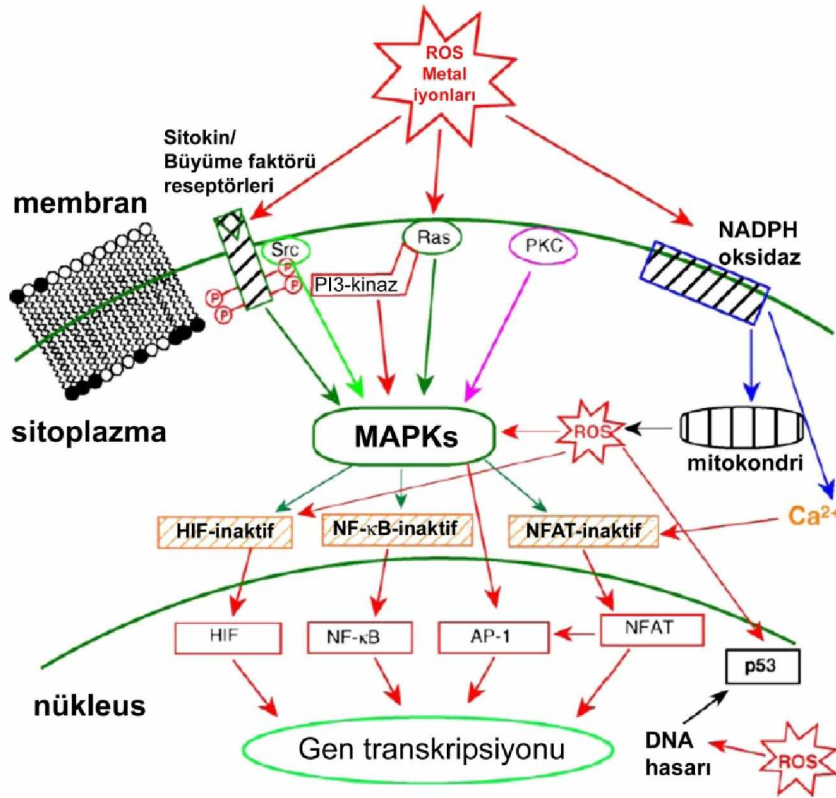
Sonuç olarak; en azından bazı malign hücrelerde reaktif türler in vivo olarak daha fazla yapılmaktadır. Antioksidan savunma ve tamir aktiviteleri bazen yükselmesine rağmen bu artış reaktif türlerle baş etmek için yeterli değildir. Malign hücrelerde fazla miktarda bulunan reaktif türler olasılıkla bu hücrelerin kendi yararınadır. Fakat miktar belli bir seviyenin üzerine çıktığında oksidatif hasar ciddi boyutlara gelir ve hücre fonksiyonları bozulur (Şekil 2).

#### **2.4.5 Oksidatif Stres, Hücre Sinyal İletimi ve Kanser**

Hücreler birbirleriyle iletişim halindedir ve ekstraselüler uyarılara karşı cevap verirler. Bu biyolojik mekanizmaya sinyal iletimi denir<sup>4,144</sup>. Sinyal iletimi hücre dışarısındaki çeşitli fonksiyonel elementlerin hücre içine geçişi ile bilginin sağlanması sürecidir. Sinyal iletimini ekstraselüler sinyaller başlatır, örneğin hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmittörler gibi<sup>145</sup>. Sinyaller, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonundan sorumludurlar. Bunlar hücre çekirdeğine geçerek DNA üzerindeki özel bağlanma bölgelerine bağlanırlar ve RNA polimeraz II aktivitesini düzenlerler. Bu sinyal iletimi kas kontraksiyonu, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve sinir iletimi gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri içerebilir<sup>146</sup>.

ROS türleri hücre hasarına yol açmakla birlikte aslında hücre içindeki sinyal iletiminin ve düzenlenmesinin bazı safhalarında önemli bir fizyolojik rol oynarlar<sup>147</sup>. Yüksek konsantrasyondaki ROS hücre ölümüne veya nekroza neden olur. Buna karşılık düşük veya geçici konsantrasyondaki radikaller hücre çoğalmasına sebep olabilir. Düşük konsantrasyondaki  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$  çoğalmayı uyarabilir ve pek çok hücre tipinde hayatta kalma olasılığını arttırabilir. Bu nedenle ROS ikincil habercilerin fonksiyonlarında önemli bir fizyolojik rol oynayabilir<sup>148</sup>. Ayrıca sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi, protein fosforilasyonunun düzenlenmesi ve bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF- $\kappa$ B ve AP-1 faktör ailesi gibi) aktivasyonunda rol alır<sup>110</sup>.

ROS ve metal iyonları öncelikle fosfoserin/treonin-, fosfotirozin- ve fosfolipit-fosfatazları inhibe eder. Büyük olasılıkla onların sistein rezidülerindeki sülfidril gruplarıyla etkileşime girerek (molekül içi veya moleküller arası disülfid bağlarını okside ederek) bunu yapar<sup>5,144</sup>. Bu yapısal değişim protein konformasyonunu değiştirir ve bu da bazı sinyal dizilerinde (özellikle growth faktör kinaz-, src/Ab1 kinaz-, MAPK- ve PI3 kinaz'a bağlı sinyal yolları) upregülasyona neden olur. Bu sinyal dizileri redoks ile düzenlenen transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF- $\kappa$ B, p53, HIF-1, NFAT) aktivasyonuna neden olur.



Şekil 9: ROS ve metal iyonlarının indüklediği sinyal yolları<sup>67</sup>

## 2.5 Üç Evre Modeli ve Karsinogenez Mekanizması

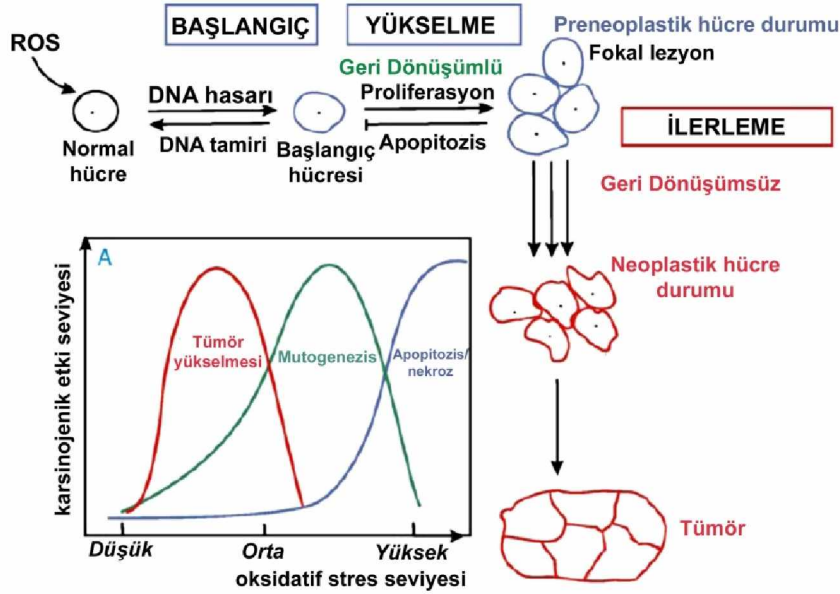
Karsinogenez karmaşık ve çoklu adımlar içeren bir süreçtir. Sağlıklı bir hücre önce prekanseröz evreye son olarak da erken evre kansere dönüşür<sup>148</sup>. Karsinogenez için birkaç teori vardır. Eski teori, kanseri “hücre farklılaşması hastalığı” veya “stem cell hastalığı” olarak tanımlar. Bu teori kanserin “tek hücre kaynağı” olduğu noktasından destek almaktadır<sup>149</sup>.

Kanser indüksiyonunda iki mekanizma önerilmektedir. Birincisi, nongenotoksik karsinojenler bölünmekte olan hücrelerde yanlış tamir ile mutasyonları indükleyebilir ve DNA sentezi ve mitoz artabilir. Mutasyonlar ve ayrıca klonları genişleyerek preneoplastik hücre durumundan neoplastik hücre durumuna geçişi başlatabilir<sup>150-152</sup>. Diğer mekanizma hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki eşitliği açıklar. Eğer DNA hasarı çok fazla ise değişime uğramış hücreler seçilerek elimine edilir. Bu sürece “apoptozis” denir. Karsinojenik süreç hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin hücre proliferasyonu lehine değişmesi olarak tanımlanabilir.

Bu mekanizmalara ek olarak gap junction (GJIP; hücrelerarası iletişim), hücre büyümesinin düzenlenmesinde, farklılaşmasında ve projenitör hücre apoptozisinde önemli rol oynar<sup>153</sup>. Aktive olan (onkogen) ve olmayan (tümör baskılayıcı gen) genler, başlayan stem cell'e klon genişlemesi ile katkıda bulunurlar.

Epidemiyolojik ipuçları ve hayvan deneyleri sonuçlarına göre karsinogenez çeşitli ve birbirinden farklı evrelerden oluşmaktadır. Her bir evrenin farklı bir karakteristiği vardır ve bu çoklu evre veya mekanizma hipotezine “initiation – promotion – progression” (başlangıç – yükselme – ilerleme) denir<sup>148,154</sup>. Kimyasal karsinojenler, bu sürecin çeşitli evrelerinde hücrel modifikasyonlar ve moleküler olaylar ile etkili olur. Kimyasal karsinojenleri genotoksik ve epigenik (non-genotoksik) olarak ikiye ayırabiliriz. Genotoksik ajanlar DNA'ya doğrudan hasar verirler ve mutasyonlara ve/veya klastojenik (kromozom hasarı) değişikliklere neden olurlar. Non-genotoksik ajanlar ise dolaylı DNA reaksiyonları ile etki ederler. Bu moleküller hücre büyümesi ve hücre ölümünü kontrol ederler ancak tam olarak mekanizma anlaşılammıştır.

Kanser gelişiminin çok aşamalı süreci, tek bir hücrede meydana gelen olayların birikmiş etkisi ile karakterizedir ve üç aşamadan oluşur; başlangıç, yükselme ve ilerleme. ROS karsinogenezin bütün evrelerinde etkindir<sup>154</sup>. Karsinogenezin üç evre modeli şekil 10'da gösterilmiştir.



**Şekil 10: Karsinogenezin üç evre modeli ve karsinojenik etkilerin seviyesi & karsinojenik sürecin çeşitli evrelerinde serbest radikal seviyeleri<sup>67</sup>**

Başlangıç evresinde ölümcül olmayan DNA mutasyonları vardır. Değişime uğrayan hücredeki bazı mekanizmalar (DNA sentezi gibi) tamir sistemleri ile düzeltilir. Bölünmeye devam eden hücredeki hasar giderilemez ise hücre döngüsü G1, S veya G2 evresinde kesilerek hasar tamir edilir ve bölünme devam eder<sup>155</sup>. ROS etkisi ile oksidatif DNA hasarı meydana gelebilir. Benign tümörlerde yapılan bazı çalışmalara göre tümör boyutu ile 8-OH-G oluşum miktarı arasında korelasyon vardır<sup>155</sup>. Başlangıç süreci oksidatif stresin indüklediği Ca(II) değişimi ile daha ileri gider. Bu değişim, hücre içi depolardan Ca(II) salınması ve hücre dışından Ca(II) içeri girmesi ile olur. Neticede hücre içi serbest kalsiyum miktarı artar<sup>156</sup>.

Yükselme evresi hücre proliferasyonun indüklenmesi ve/veya hücre ölümünün (apoptozis) inhibe olması ile karakterizedir. Bu süreç sonucunda tanımlanabilir fokal lezyonlar oluşur. Bu evrede doza bağlı olarak tümör yükselme uyarısının sürekli olması gerekmektedir. Bu nedenle de geri dönüşümlü bir süreçtir<sup>155</sup>. Birçok tümör geliştiriciler (promotor) antioksidan savunma sistemi etkileri için güçlü inhibitörlerdir. Yüksek düzeydeki oksidatif stres hücre için sitotoksiktir ve apoptoz veya nekroz sürecinin başlamasını da engeller. Halbuki düşük düzeydeki oksidatif stres yükselme evresinde hücre bölünmesini uyarır ve böylece tümör büyümesini destekler<sup>156</sup>. Buradan şu anlamı çıkarabiliriz; karsinogenezin bu evresindeki ROS üretimi tümör gelişimindeki ana hattı oluşturur.

İlerleme evresi karsinogenezin üçüncü ve son aşamasıdır<sup>154</sup>. Bu evrede hücrel ve moleküler değişiklikler vardır ve preneoplastik

durumdan neoplastik duruma geçiş söz konusudur. Bu aşama geri dönüşümsüzdür ve birikmiş fazla miktarda genetik hasar ile karakterizedir. Bu durum hücrenin benign halden malign hale geçmesine neden olur. Bu aşamada genetik instabilite ve kromozom bütünlüğü bozulur.

## 2.6 Antioksidan Savunma

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin etkileri nonenzimatik ve enzimatik antioksidanlar ile dengelenmektedir. Antioksidan savunma serbest radikallerin doğrudan temizlenmesinde önemli rol oynarlar ve böylece organizmanın maksimum korunmasının sağlarlar. İyi bir antioksidan: (i) özellikle serbest radikalleri temizleyebilmeli; (ii) redoks metallere şelat yapabilmeli; (iii) diğer antioksidanlarla reaksiyona girebilmeli (rejenere) (iv) gen ekspresyonu üzerine pozitif etkisi olmalı; (v) kolaylıkla absorbe edilmeli; (vi) doku ve vücut sıvılarında yeterli konsantrasyonda olmalı; (vii) sulu ortamlarda ve/veya membranda çalışabilmelidir.

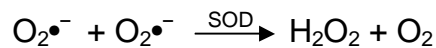
En etkili enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır<sup>157</sup>. Nonenzimatik antioksidanlar ise vitamin C, vitamin E, karotinoidler, tiol antioksidanları (glutatyon, tioredoksin ve lipoik asit), doğal flavonoidler, pineal bez hormonları olan melatonin ve diğer bileşiklerdir<sup>158</sup>. Bazı antioksidanlar hidrofilik ortamda, bazıları hidrofobik ortamda, bazıları ise her iki ortamda etkilidirler. Örneğin vitamin C süperoksit ile sulu ortamda reaksiyona girerken vitamin E lipofilik fazda girer. Buna karşılık α-lipoik asit hem suda hem de yağda çözünebilir ve bu nedenle hücre membranında ve sitozolde çalışabilir.

Bazı antioksidanlar diğer antioksidanlarla yeniden üretilebilirler. Bu yüzden orijinal fonksiyonlarına geri dönebilirler. Bu süreç "antioksidan network" denir. Vitamin C ve E'nin redoks döngüsü antioksidan network'e örnektir. Bir antioksidanın rejenere kapasitesi çiftin redoks potansiyeline bağlıdır. Tümör hücrelerinde ROS seviyesinin yüksekliği ile enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların bozulması arasında bir bağ vardır.

### 2.6.1 Enzimatik Antioksidanlar

#### 2.6.1.1 Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) hücre içi enzimatik antioksidanların en etkililerindedir. SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismute eden bir metalloenzimdir<sup>160</sup>.



**Tablo 3: Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri**

<b>Enzimatik antioksidanlar</b>	<b>Etkileri</b>
Sitokrom oksidaz sistemi	Hücrelerdeki O <sub>2</sub> 'nin %95-99'nun detoksifikasyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit anyonunun detoksifikasyonu
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksidin detoksifikasyonu
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Hidrojen peroksidin detoksifikasyonu
Glutasyon redüktaz	Okside glutasyonun indirgenmesi
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz	NADP'nin NADPH'a dönüşmesi

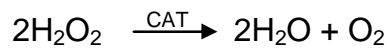
  

<b>Nonenzimatik antioksidanlar</b>	<b>Etkileri</b>
α-tokoferol	Zincir kırıcı antioksidan
β-karoten	Radikal tutucu
Askorbik asit	•OH radikali tutucu
Glutasyon	Hücre içi sülfidril tamponu
Albümin	Hem ve bakır bağlar
Seruloplazmin	Bakır bağlar
Haptoglobulin	Hemoglobin bağlar
Transferrin	Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Dokudaki demir iyonlarını bağlar
Hemopeksin	Hem bağlayıcı proteindir
Bilirubin	Peroksil radikali tutucu
Ürat	Radikal tutucudur, metal iyonlarını bağlar
Glukoz	•OH radikali tutucudur
Sistein	Radikal tutucu
Koenzim Q	Antioksidanlarla etkileşebilir

İnsanlarda üç değişik SOD izoformu bulunur: sitozolik CuZnSOD; mitokondrial MnSOD ve ekstraselüler SOD (ECSOD)<sup>161</sup>.

### 2.6.1.2 Katalaz

Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) bitki, hayvan ve aerobik bakteri hücrelerinde bulunur<sup>157</sup>. Katalaz hücrede peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene çevirmede çok etkilidir. Katalaz bütün enzimler içinde en yüksek turnover oranına sahip enzimlerden birisidir, bir molekül katalaz dakikada ~6 milyon molekül hidrojen peroksidi su ve oksijene çevirir:

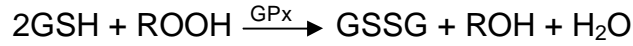
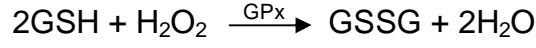


Çeşitli tümörlerde hidrojen peroksidi detoksifiye etme kapasitesindeki azalma ile katalaz seviyesinin azalması arasında bir ilişki vardır.



### 2.6.1.3 Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidazın iki formu vardır: (i) selenyumdan bağımsız glutasyon-S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18); (ii) selenyum bağımlı (GPx; EC 1.11.1.19)<sup>157</sup>. Bu iki enzim alt gruplarının sayısı, aktif merkezde selenyumun bağlanması ve katalitik mekanizmaları ile birbirlerinden farklıdır. Glutasyon (GSH) metabolizması, antioksidan savunma mekanizması için zaruridir. GPx, bir tripeptid olan GSH ile birlikte hareket eder. GSH hücre içerisinde yüksek konsantrasyonlarda (mikromolar) bulunur. GPx substrat olarak hidrojen peroksiti kullanır ve organik peroksite ROOH çevirir. Daha sonra GPx, peroksiti suya (veya alkol) parçalar:



GPx katalaz ile hidrojen peroksit için yarışır ve düşük seviyedeki oksidatif stresten korunmada ana etkenlerden biridir.

## 2.7 DNA Hasarının Ölçülmesi

Hayvan veya insan hücre ve dokularından DNA izole edilip oksidatif hasar ürünleri ölçüldüğünde aslında hasar ve tamir mekanizmaları arasındaki denge ölçülmüş olur. Bu yüzden oksidatif DNA hasarındaki artış hasarın artması ve/veya tamirin azalmasından dolayıdır. Bu ölçümler toplam DNA hasarı hakkında göstergeler verir, inaktif genler veya durağan DNA hasarı hakkında bilgi vermez<sup>162</sup>.

Serbest oksijen radikallerinin DNA'ya saldırması sonucu oluşan beş oksidatif baz çalışılabilir; 8-hidroksideoksiguanozin, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, formilamidopirimidin ve 8-hidroksideoksiadenin<sup>163,164</sup>.

### 2.7.1 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG)

Oksidatif DNA hasarı göstergesi olarak en çok çalışılan parametre 8-OHdG'dir. Fakat pek çok araştırmacı, ROS'un mutasyon yapabilme kapasitesinin tamamını ölçebilmek için her bir DNA modifikasyonunu çalışma eğilimindedir. Fakat muhtemelen 8-OHdG oluşumu organizmaya, ROS tipine ve etkiye maruz kalma süresine bakmasızın diğer DNA modifikasyonları ile orantılıdır. Bu yüzden 8-OHdG ölçülerek oksijen radikallerinin indüklediği hasarın hesaplanması çok kullanışlı olacaktır<sup>165</sup>.

Pek çok çevresel mutajen ve karsinojenin DNA bileşikleriyle metabolik aktivasyon olsun veya olmasın reaksiyona girdiği bilinmektedir.

Sonuç olarak adenin, guanin, sitozin ve timin ile yeni bileşikler oluşturur. Tüm bu hedefler içinde bilinen en reaktifi guanindir<sup>166</sup>. İn vitro DNA sentezi çalışmalarında, DNA replikasyonu sırasında nokta mutasyon oluşturan 8-OHdG'nin yanlış okunmasından dolayı potansiyel mutajen olduğu gösterilmiştir. Okside guanin bazı in vitro modelde DNA replikasyonu sırasında G-T ve A-C değişimine sebep olmuştur. Bu çalışma in vivo ortamda hücre DNA'sında 8-OHdG oluşumunun karsinogenez ile ilişkili olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Farelerle yapılan bir çalışmada tüm vücuda radyasyon verilmiş ve karaciğer hücre DNA'sı ile HeLa hücre DNA'sında 8-OHdG oluşumu saptanmıştır. Açığa çıkan 8-OHdG in vitro deneyden yapılandan yaklaşık 1000 kez daha azdır<sup>167</sup>.

### 2.7.2 Timin glikol (Tg)

hNTH1 (insan homolog endonükleaz III) bir glikozilazdır ve AP liyaz aktivitesi ile ilişkilidir. Bu enzimin görevleri arasında Tg gibi okside pirimidinlerin tamiri vardır<sup>168-171</sup>.

İdrarla dışarı atılan Tg (2'-deoksinükleozid) analiz edilebilir<sup>172,173</sup>. Böbrek transplantasyonu yapılan altı hasta ve altı sağlıklı kişiyle idrarda zamana bağlı olarak Tg atılım oranındaki değişim takip edilmiştir. Transplantasyondan sonra idrarda Tg atılımı yükselmiştir ve bu yükseklik nakil yapılan böbrekteki oksidatif hasara bağlı olabilir.

### 2.7.3 5-hidroksiurasil (5-OHUr)

5-OHUr'in DNA lezyonu olan sitozil glikolden su kaybı ve deaminasyon yolu ile oluştuğu sanılmaktadır. Modifiye bir pirimidin olan 5-OHUr de hNTH1'in substratıdır ve hücre ekstralarında bu lezyonların tamirinin erken bir göstergesidir<sup>170,174,175</sup>. Bundan başka 5-OHUr insan urasil DNA N-glikozilaz ile de tamir edilebilir<sup>176</sup>.

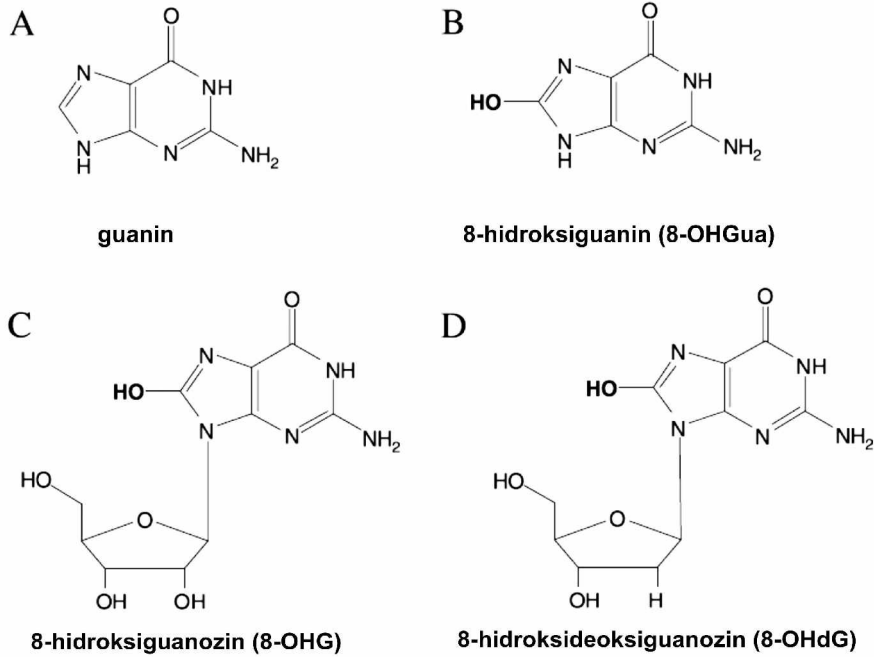
### 2.7.4 8-oxoadenin (8-oxoA)

8-oxoA daha önce insan idrarında çalışılmış olmasına rağmen<sup>177</sup> bu lezyonun tamir mekanizması ve kalıntılarının atılımı tam olarak açıklanmamıştır. Buna sebep olarak bu lezyonun oluşumunun ve hücre DNA'sında tespitinin zor olması gösterilmektedir. Şu ana kadar 2'-deoksinükleozid formu olan 8-oxo-2'-deoksiadenozin (8-oxodA) idrarda tespit edilememiştir. Detaylı çalışılmış olmamasına rağmen 8-oxoA ve 8-oxodA'nin DNA tamirinden dolayı idrarda atılımını açıklayan iki yol (kesin olmayan) vardır. Birincisi, hMTH1 (insan MutT homolog protein 1) substrat olarak 8-oxo-dGTP'ye benzer etkinlik gösteren 8-oxodATP'yi kullanır ve 8-oxodA oluşabilir. Daha sonra da atılır<sup>177</sup>. İkincisi, sitozin karşıtı ile eşleştğinde muhtemelen 8-oxodATP'nin yanlış birleştirilmesi sonucu oluşan 8-oxoA, hOgg1 (8-oxoguanin DNA glikozilaz)'in substratı olur<sup>178</sup>.

## 2.8 İdrar 8-OHdG Nasıl Ölçülür?

8-hidroksideoksiguanazinin nasıl ölçüldüğüne geçmeden önce bazı terimler ve kısaltmalar hakkında açıklamalar yapmak gerekmektedir.

- 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin ve 8-hidroksiguanaozin, 8-OHdG'dir.
- 8-OHdG DNA'nın okside ürünü iken 8-OHG RNA'nın okside ürünüdür.
- 8-OHGua serbest guanin bazının okside ürünüdür.
- 8-OHGua ve 8-oxoGua aynıdır.
- 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), 8-oxo-2'-deoksiguanozin (oxo8dG), 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoksiguanozin (8-oxo-dG) ve 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG) aynıdır.
- 8-oxo-guanin, 8-oxoG, 8-hidroksiguanin, 7,8-dihidro-8-oxo-guanin ve 7-oxo-7,8-dihidroguanin aynı okside serbest bazdır<sup>179</sup>.



Şekil 11: 8-OHdG ve analoglarının kimyasal yapıları

### 2.8.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Şu ana kadar elektrokimyasal detektörlü HPLC sistemi 8-OHdG ölçümü için en çok kullanılan cihazdır. HPLC metodu ile doku, plazma ve lenfositlerdeki 8-OHdG miktarları ölçülebilir. Lenfosit ve doku 8-OHdG ölçümü için, nükleer DNA'daki 8-OHdG'nin enzimatik yollarla çözülebilir bileşiklere salınması gerekir. Bu metodun avantajı aynı anda birden çok okside ürünün ölçülebilmesidir.

HPLC metodu ile plazma ve idrarda enzimatik hazım (digestion) işlemi olmadan serbest 8-OHdG de çalışılabilir. Fakat bu prosedür 8-OHdG izolasyonu sırasında çok ayrıntılı ekstraksiyon ve ayırma işlemleri içermektedir<sup>180,181</sup>.

### **2.8.2 Tandem Mass Spektrometre**

Son zamanlarda guanin'in 8-hidroksile ürünlerini ölçmek için ekstraksiyon işlemlerini ortadan kaldıran teknikler geliştirilmiştir. Bu metotta idrar HPLC-tandem mass spektrometre sistemine doğrudan enjekte edilmektedir<sup>182</sup>. Bu metot 8-hidroksile bazları, ribonükleozidleri, deoksinükleozidleri ve benzer nonokside türleri ölçebilmektedir.

### **2.8.3 ELISA**

İdrar 8-OHdG ve analoglarını ölçmek için HPLC-tandem mass spektrometre sistemi geliştirilmiş olmasına rağmen klinik laboratuvarlarda kullanım için hala çok komplekstir. Bu nedenle serbest 8-OHdG ölçebilmek için daha basit olan ELISA yöntemi geliştirilmiştir<sup>183</sup>. Şu anda doku, idrar, serum ve plazma 8-OHdG ölçümleri yapabilmek için ELISA kitleri mevcuttur.

## **2.9 Ürolojik Kanserler ve Sınıflandırılması**

### **2.9.1 Prostat Kanseri**

Prostat kanseri günümüzde erkek toplumunu ilgilendiren başlıca sağlık problemlerinden biridir. Avrupa'da her yıl yaklaşık 2,6 milyon yeni kanser tanısı konulmaktadır. Avrupa'daki tüm erkek kanserlerinin %11'ini prostat kanseri oluşturmaktadır<sup>184</sup> ve bu değer Avrupa Birliği'ndeki (AB) kanser ölümlerinin %9'unu oluşturmaktadır<sup>185</sup>.

#### Gleason Skoru:

Prostat adenokarsinomunun derecelendirilmesinde en sık kullanılan sistem Gleason skorlamasıdır<sup>186</sup>. İki en az agresif, 10 en fazla agresif olmak üzere sistem 2–10 arası bir değer vererek skoru belirtir. Bu skor tümörde en çok bulunan iki desenin toplamıdır (derece 1–5). Grade 1 en iyi diferansiye (farklılaşmış) ve grade 5 en az diferansiye (farklılaşmamış) olanı göstermek üzere 1'den 5'e kadar sıralanan derecelerden ibarettir. Biyopsi materyali (iğne biyopsisi veya cerrahi materyal) Gleason skorunu değerlendirebilmek için gereklidir, sitolojik örnekler kullanılmamalıdır.

## Sınıflandırma:

**Tablo 4: Prostat kanseri TNM sınıflandırması**

<b>T: Primer Tümör</b>	
Tx	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
T1	Klinik olarak saptanamayan, palpe edilemeyen ve görüntülenmeyen tümör
T1a	Re rezeke edilen dokunun %5 veya daha azında rastlantısal olarak histolojik tümör saptanması
T1b	Rezeke edilen dokunun %5'inden fazlasında rastlantısal olarak histolojik tümör saptanması
T1c	İğne biyopsisinde tümör saptanması (örn. yükselmiş prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi nedeniyle)
T2	Prostat'ta sınırlı tümör
T2a	Bir lobun yarısını veya daha azını kapsayan tümör
T2b	İki lobu birden kapsamayan yalnız bir lobun yarısından fazlasını kapsayan tümör
T2c	Her iki lobu kapsayan tümör
T3	Prostat kapsülünü aşmış tümör
T3a	Ekstrakapsüler yayılım (tek veya çift taraflı)
T3b	Tümör seminal vezikül(leri) tutmuş
T4	Tümör fiske veya seminal vezikülün dışındaki komşu yapılara yayılmış: mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kaslar veya pelvik duvar

<b>N: Bölgesel lenf nodları</b>	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut

<b>M: Uzak Metastaz</b>	
Mx	Uzak metastaz değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz
M1a	Bölgesel olmayan lenf nod(ları)
M1b	Kemik(lere)
M1c	Diğer alan(lar)

### 2.9.2 Mesane Kanseri

Mesane tümörleri farklı kategorilerde değerlendirilebilirler: TaT1 papiller tümörler (kas-invaziv olmayan mesane kanseri), üst üriner sistem tümörleri, karsinoma in situ (CIS), kas-invaziv mesane tümörleri. Mesane kanserli hastalarında yaklaşık %75-85'inde hastalık mukoza (evre Ta-CIS) veya submukoza ile (evre T1) sınırlıdır. Mesane tümörlerinin gelişimindeki etiyolojik faktörlerin çoğu bilinmemektedir. Ancak ürotelial kanserojenlere maruz kalan bazı meslek grupları risk altındadır<sup>187</sup>. Bunlar matbaacılık, demir ve alüminyum işlemeciliği, endüstriyel boyacılık, gaz ve katran üretimidir.

### Sınıflandırma:

2002 yılında UICC (The Union International Contre le Cancer) tarafından yapılan bu sınıflama<sup>188</sup> büyük ölçüde kabul görmüştür ve 1992 ve 1997’de yapılan sınıflamalardan T2 evresi bakımından farklıdır.

**Tablo 5: Mesane kanserinin 2002 TNM sınıflandırması**

<b>T: Primer Tümör</b>	
Tx	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Ta	Non-invaziv papiller karsinoma
Tis	Karsinoma insitu: “düz tümör”
T1	Tümör subepitelial bağ dokusunu tutar
T2	Tümör kası tutar
T2a	Tümör yüzeysel kası tutar (iç yarı)
T2b	Tümör derin kası tutar (dış yarı)
T3	Tümör perivezikal dokuyu tutar
T3a	Mikroskobik olarak
T3b	Makroskobik olarak (mesane dışı kitle)
T4	Tümör şu dokulardan herhangi birini tutar: prostat, uterus, vajen, pelvik duvar, abdominal duvar
T4a	Tümör prostat, uterus veya vajeni tutar
T4b	Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutar

<b>N: Bölgesel lenf nodları</b>	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	En büyük boyutu 2 cm veya altında tek bir lenf nodu metastazı
N2	En büyük boyutu 2 cm’den büyük ama 5 cm’den küçük tek bir lenf nodu metastazı veya hiç biri 5 cm’den büyük olmayan çok sayıda lenf nodu
N3	En büyük boyutu 5 cm’den fazla olan lenf nodu metastazı

<b>M: Uzak metastaz</b>	
Mx	Uzak metastazlar değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

### **2.9.3 Böbrek Hücreli Karsinom**

Böbrek hücreli karsinom (BHK) tüm kanserlerin %2-3’ünü oluşturur<sup>189</sup> ve en yüksek insidans gelişmiş ülkelerde görülür. Böbrek hücreli karsinom böbrek içinde en sık gelişen lezyondur ve belirli histopatolojik ve genetik özellikleri olan değişik BHK tiplerinden oluşur<sup>190</sup>. Erkeklerde kadınlara göre 1,5:1 oranında daha sık görülür ve en yüksek insidans 60-70 yaş arasıdır.

## Sınıflandırma:

**Tablo 6: Böbrek hücreli karsinom 2002 TNM sınıflandırması**

<b>T: Primer Tümör</b>	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok
T1	Tümör en büyük çapı $\leq$ 7 cm, böbrek içinde sınırlı
T1a	Tümör en büyük çapı $\leq$ 4 cm, böbrek içinde sınırlı
T1b	Tümör en büyük çapı $>$ 4 cm ancak $\leq$ 7 cm, böbrek içinde sınırlı
T2	Tümör en büyük çapı $>$ 7 cm, böbrek içinde sınırlı
T3	Tümör büyük venler içine uzanıyor veya doğrudan adrenal bez veya böbrek çevresi dokulara yayılıyor ancak Gerato fasyası dışına çıkmamış
T3a	Tümör doğrudan adrenal bez veya böbrek çevresi dokulara yayılıyor ancak Gerato fasyası dışına çıkmamış
T3b	Tümör makroskobik olarak böbrek ven(ler)inin veya segmental dalların veya vena kavanın diyafragma altındaki kısmı içine uzanıyor
T3c	Tümör makroskobik olarak vena kavanın diyafragma üstündeki kısmının içine veya duvarına uzanıyor
T4	Tümör doğrudan Gerato fasyası dışına yayılıyor

<b>N: Bölgesel lenf nodu</b>	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bir bölgesel lenf nodunda metastaz var
N2	Birden fazla lenf nodunda metastaz var

<b>M: Uzak metastaz</b>	
Mx	Uzak metastazlar değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

### 3 GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana bilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Kullanılan Gereçler

##### 3.1.1 Hasta Grupları

Çalışmaya katılan gönüllüler, üriner sistem kanser ve taş rahatsızlığı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Ana bilim Dalı Kliniğine başvuran hastalar ve bu hastalara benzer özellik gösteren sağlıklı bireylerden seçilmiştir. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Etik kurulunun 16.04.2006 tarih ve 146 numaralı izni ile yapılmıştır.

Çalışmadaki gönüllüler beş gruba ayrıldı (Tablo);

Grup I: Prostat, mesane ve/veya böbrek kanseri tanısı almış ama henüz tedavi almamış hastalar (n=25).

Grup II: Prostat, mesane ve/veya böbrek kanseri tanısı almış ve cerrahi girişim ile kanserli doku uzaklaştırılmış hastalar (n=14). Bu on dört hastanın altı tanesi prostat kanserli olup radikal retropubik prostatektomi (RRP) ve transüretral prostat rezeksiyonu (TurP), dört tanesi mesane kanserli ve transüretral mesane tümör rezeksiyonu (TurM), dört tanesi de böbrek hücreli karsinom (BHK)'dur ve radikal nefrektomi ile laparoskopik parsiyel nefrektomi (LPN) yöntemleri uygulanmıştır.

Grup III: Benign prostat hiperplazisi (BPH) tanısı almış ancak tedavi edilmemiş hastalar (n=9).

Grup IV: Üriner sistemde taş bulunan hastalar (n=6).

Grup V: Kontrol grubu (n=10).

**Tablo 7: Hasta özellikleri**

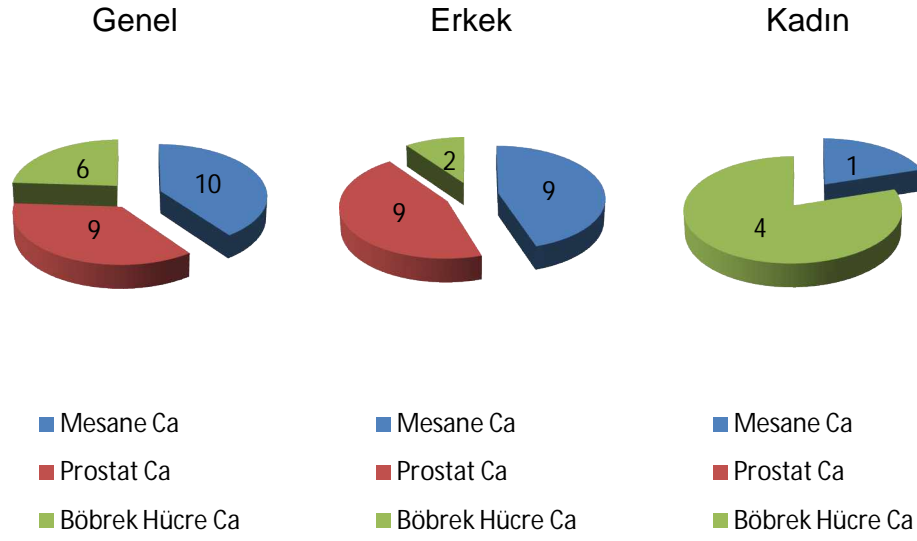
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
	n=25	n=14	n=9	n=6	n=10
<b>Cinsiyet</b>					
Kadın	5	4	--	1	5
Erkek	20	10	9	5	5
<b>Yaş</b>	64,0 ± 13,4	62,1 ± 15,3	68,8 ± 10,7	41,8 ± 10,3	29,8 ± 1,9
Kadın	53,2 ± 20,9	54,8 ± 23,8	--	50	29,2 ± 1,9
Erkek	66,8 ± 9,7	65,1 ± 10,7	68,8 ± 10,7	40,2 ± 10,7	30,4 ± 1,8



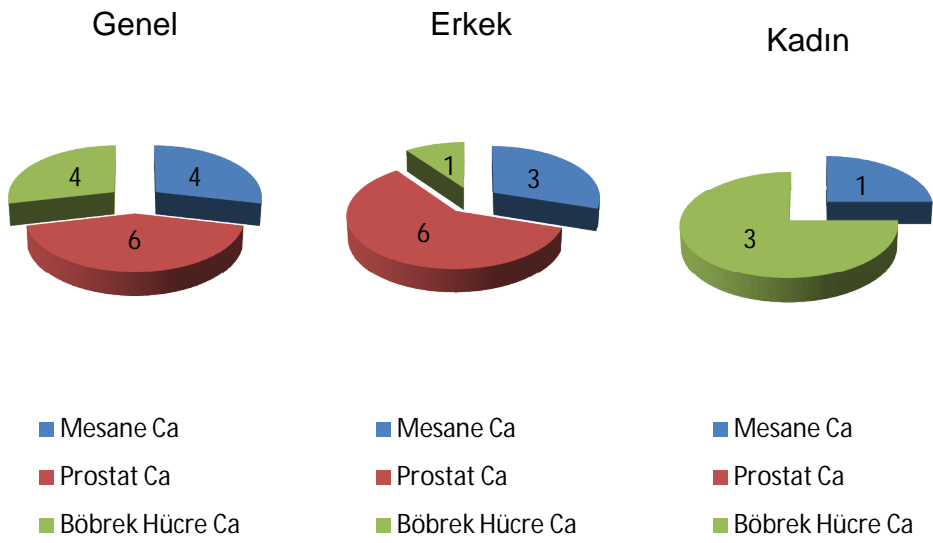
**Tablo 8: Grup I ve II hasta özellikleri**

Tanı			Grup I	Grup II
Mesane Ca	Cinsiyet	Erkek	9	3
		Kadın	1	1
	Evre	G1	1	--
		G2	5	3
		G3	4	1
	TNM	T1N0M0	7	3
		T2aN0M0	1	--
		T3bNxM0	1	--
		TaN0M0	1	1
	Tedavi	R.Sistektomi	1	--
TurM		9	4	
Prostat Ca	Cinsiyet	Erkek	9	6
		Kadın	--	--
	Evre	G2+2	2	1
		G3+2	3	3
		G3+4	2	--
		G4+3	1	1
		G5+4	1	1
	TNM	T2aN0M0	5	3
		T3aN0M0	4	3
	Tedavi	RRP	8	5
TurP		1	1	
Böbrek Hücreli Ca	Cinsiyet	Erkek	2	1
		Kadın	4	3
	Evre	G1	4	2
		G2	1	1
		G3	1	1
	TNM	T1aN0M0	3	2
		T1N0M0	3	2
	Tedavi	LPN	1	1
		R.Nefrektomi	5	3

Tüm gönüllülerden yirmi dört saatlik idrar toplandı ve bu örneklerden idrar kreatinin çalışıldı. Daha sonra idrar örneklerinden 5 ml alındı ve beş altı damla 2 M HCl asit eklenerek idrar pH'sı 4–5 civarına düşürüldü. Ayrılan numuneler -20 °C'de analiz gününe kadar saklandı.



**Grafik 1: Grup I hasta dağılımı**



**Grafik 2: Grup II hasta dağılımı**

### 3.1.2 Kullanılan Aletler

- Santrifüj (Nüve CN 180)
- Hassas terazi (Precisa 205A SCS)
- pH metre (Mettler Toledo MP220)
- Vakum pompası (Waters)
- Vortex (Velp Scientifica)
- Derin dondurucu (İndesit)
- Biyokimya oto analizörü (Abbot Aeroset)
- Sonikatör (Virtis)
- Konsantratör
- HPLC (Thermo Finnigan)
- Elektrokimyasal dedektör (Recipe EC3000)
- Kolon (Phenomenex)
- Ön kolon (Waters)
- Kağıt filtre (Bio-Crom)

Ayrıca araştırma laboratuvarında biyokimyasal analizler için gerekli olan malzemeler kullanıldı.

### 3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

8-OHdG standardı Sigma; asetonitril (HPLC grade), metanol (HPLC grade),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , HCl, NaOH Merck; idrar kreatinin kiti Abbott kullanılmıştır. Yüksek saflıkta azot gazı BOS' tan temin edilmiştir.

## 3.2 Uygulanan Yöntemler

### 3.2.1 Metotların Uygulanması

#### 3.2.1.1 İdrar Kreatinin Ölçülmesi

Kreatinin ölçüm metodu, kreatinin ile sodyum pikrat arasındaki tepkimeye dayanmaktadır<sup>191</sup>. Bu metotta; örnekte bulunan kreatinin alkali pH'da pikrat ile kreatinin-pikrat bileşiği oluşturur. 500 nm'da bu bileşiğe bağlı oluşan absorbans yükselmesi örnek içindeki kreatinin miktarını gösterir. Sonuçlar mg/dl olarak verilir.

$V = 24$  saatlik idrar hacmi (ml)

$c =$  idrar kreatinin konsantrasyonu (mg/dl)

24 saatlik idrar kreatinin hesaplanması=  $[(V \times c) / 100]$  mg / gün

### 3.2.1.2 İdrar 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG) Ölçülmesi

İdrar 8-OHdG seviyeleri pek çok metotla ölçülebilmektedir. Ancak biz Germadnik ve ark.<sup>180</sup> geliştirdiği yöntemin bizim şartlarımıza göre değiştirilmiş halini kullandık.

#### HPLC cihaz parametreleri:

- Kolon: Phenomenex C<sub>18</sub> LiChrospher/Superspher, 125 x 4 mm, 4 µm
- Kolon Sıcaklığı: 40°C
- Örnek yükleme: Otomatik
- Enjeksiyon: 30 µl
- Akış hızı: 0,7 ml/dk
- Dedektör: Elektrokimyasal dedektör (Recipe EC 3000)



Resim 1: Thermo Finnigan HPLC cihazı ve elektrokimyasal dedektör

#### 8-OHdG standardının hazırlanması:

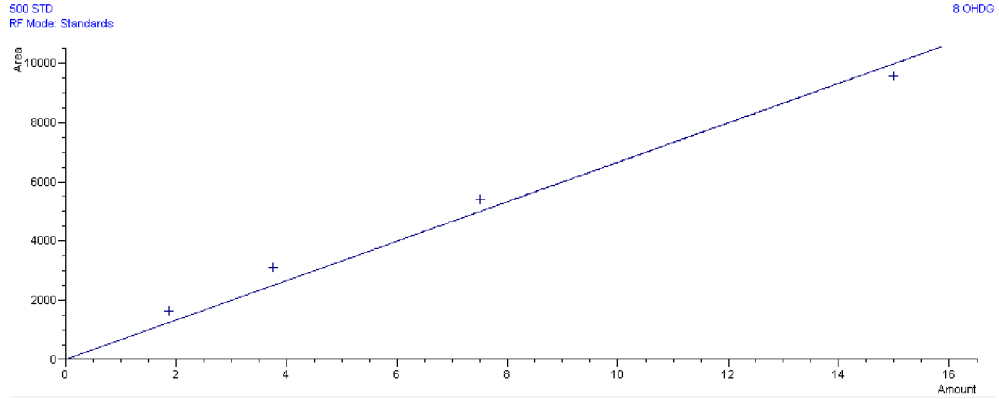
- 5 mg 8-OHdG standardı 100 ml distile su içinde çözülerek 176 µM'lık ilk stok standart hazırlandı.
- Daha sonra bu stok standart 1/10 sulandırıldı (17,6 µM) ve eşit miktarlarda ayrılarak -20°C'de saklandı.
- Çalışma standartları 500, 250, 125 ve 62,5 nM olacak şekilde distile su ile stok standarttan hazırlandı.

Denemeler sırasında 8-OHdG'nin kolondan kaçınıcı dakikada çıkacağını tespit edebilmek için hiçbir işlemde geçmemiş 125 nM 8-

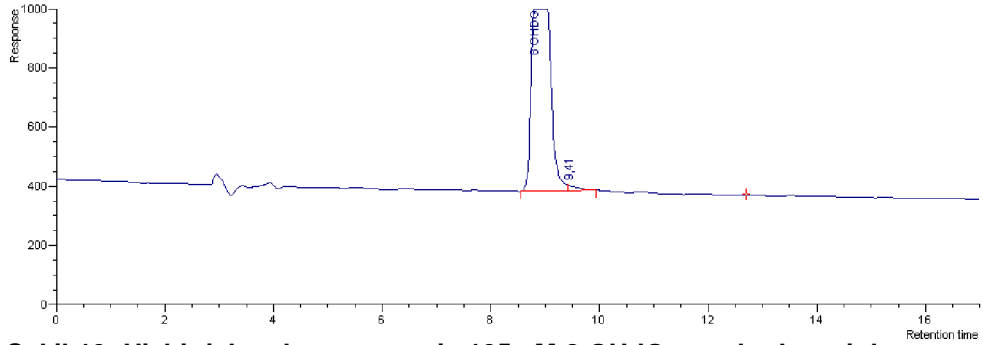
OHdG standardı verildi. Yaklaşık olarak 8-10 dk civarında 8-OHdG piki elde edilmiştir. Standart daha sonraki çalışmalarda numunelerle aynı işleme tabi tutulmuş ve yine 8-10 dk aralığında pik elde edilmiştir. Yapılan her denemede standartların alan ölçümleri birbirine yaklaşık çıkmıştır.

**Tablo 9: 8-OHdG standartları**

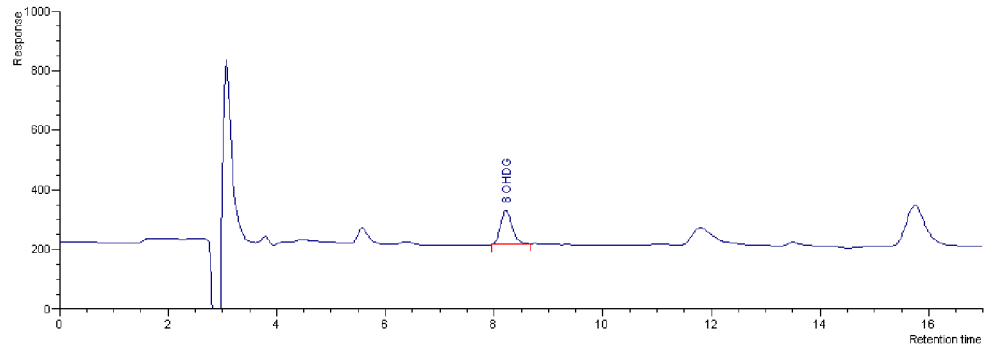
Konsantrasyon (nM)	Alan
62,5	1625,4
125	3115,3
250	5418,1
500	9574,4



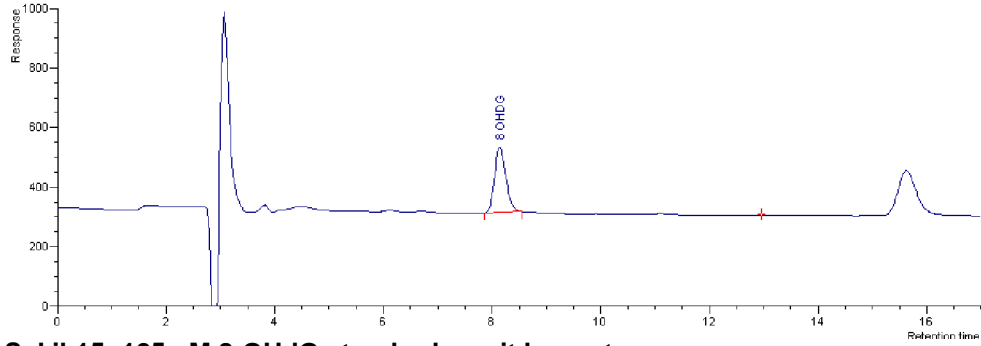
**Şekil 12: 8-OHdG standart eğrisi**



**Şekil 13: Hiçbir işlemten geçmemiş 125 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram**



**Şekil 14: 62,5 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram**



**Şekil 15: 125 nM 8-OHdG standardına ait kromatogram**

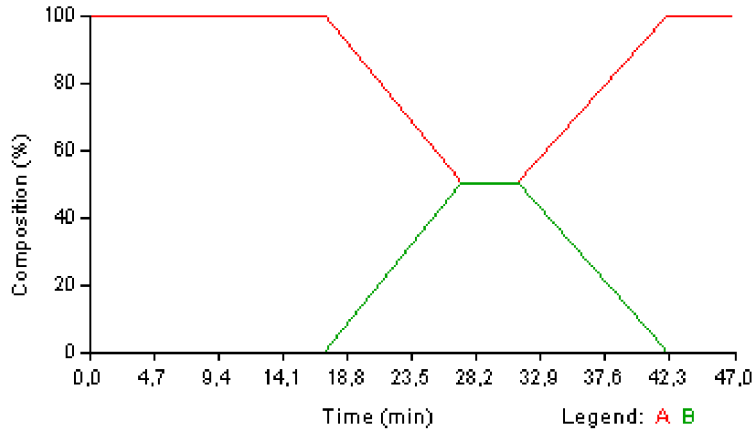
#### Solüsyonların hazırlanması:

- Mobil faz: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 3,5), %2,5 asetonitril, %1 metanol
- Yıkama solüsyonu: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 3,5), %25 asetonitril, %25 metanol
- Tampon solüsyon: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7,5)
- %5 metanol: 5 ml metanol alınır ve son hacim 100 ml'ye tampon solüsyon ile tamamlanır.
- %15 metanol: 15 ml metanol alınır ve son hacim 100 ml'ye tampon solüsyon ile tamamlanır.
- %20 metanol: 20 ml metanol alınır ve son hacim 100 ml'ye tampon solüsyon ile tamamlanır.
- 2 M HCl
- 2 M NaOH

Hazırlanan solüsyonlar 5 gün içinde kullanılmalıdır.

#### Solüsyon akış şeması:

Bir numunenin kolondan çıkması ve kolonun tamamen temizlenmesi 47 dk sürmektedir. 0-17 dk arası %100 mobil faz, 18-27 dk arası %0-50 yıkama solüsyonu, 28-32 dk arası %50 yıkama solüsyonu, 33-42 dk arası %50-0 yıkama solüsyonu, 43-47 dk arası %100 mobil faz akmaktadır ve akış hızı 0,7 ml/dk'dır.



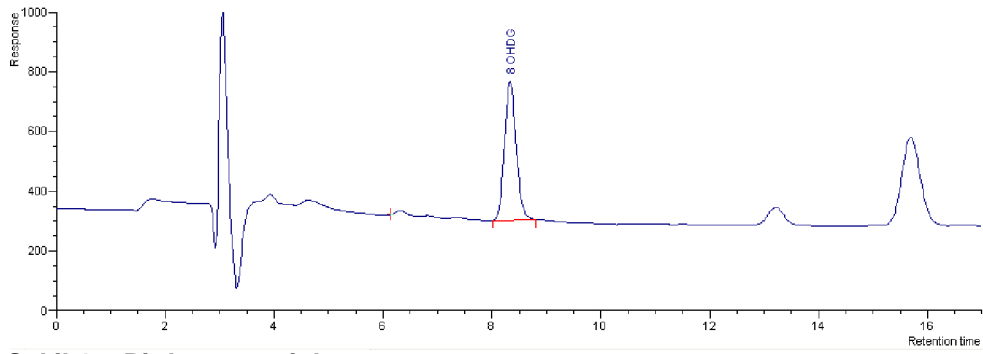
**Şekil 16: Akış şeması (A: Mobil faz, B: Yıkama solüsyonu)**

**Numunelerin hazırlanması:**

- a) İlk olarak çözülen idrarlar 1500 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Süpernatanda çalışılır.
- b) Kolon şartlama: Her bir numune için iki tane ön kolon kullanılır.
  - 10 ml metanol ön kolona eklenir ve süzülmesi beklenir.
  - 5 ml distile su eklenir ve süzülmesi beklenir.
  - 10 ml 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH:7,5) tampon eklenir ve süzülmesi beklenir.
- c) I. Ekstraksiyon:
  - Temiz bir tüp içerisinde 2 ml idrar veya standart, üzerine 0,5 ml 500 nM 8-OHdG standardı eklenir. Yaklaşık 30 sn vortekslenir.
  - Bu karışım daha önceden şartlanmış ön kolona eklenir ve süzülmesi beklenir.
  - 3 ml tampon ile ön kolon yıkanır ve süzüntü atılır.
  - 3 ml %5 metanol-tampon karışımı ile yıkanır ve süzüntü atılır.
  - Kolon temiz bir tüpe aktarılır ve %15 metanol-tampon karışımı ile yıkanır.
  - Süzüntü 5 ml distile su ile dilüe edilir. Yaklaşık 30 sn vortekslenir.
- d) II. Ekstraksiyon:
  - Dilüe edilmiş süzüntü temiz ve daha önceden şartlanmış ön kolona eklenir.
  - Vakum altında kurutulur.

- Ön kolon temiz bir tüpe aktarılır ve 1,5 ml %20 metanol-tampon karışımı eklenir.
- Toplanan süzüntüde ki metanol 1,5 saat süresince buharlaştırılarak numune konsantre edilir.
- Konsantre edilen numune 1,5 ml tampon solüsyon ile sulandırılır ve yaklaşık 1 dk vortekslenir. Enjeksiyona hazır hale gelir.

8-OHdG sonuçları nM olarak verilmiştir.



**Şekil 17: Bir hastaya ait kromatogram**

### Hesaplanması:

8-OHdG / 24 saatlik idrar kreatinin= nM / mg kreatinin

### **3.3 İstatistikî Analiz**

Verilerin istatistikî bilgileri Statistical Packege for Social Sciences (SPSS) 11,0 for Windows programı ile elde edilmiştir. Gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. İkili grup karşılaştırılmasında Mann-Withney U analizi kullanılmıştır. Hastaların ameliyat öncesi ve sonrası değerlendirmeleri Wilcoxon analizi ile yapılmıştır.



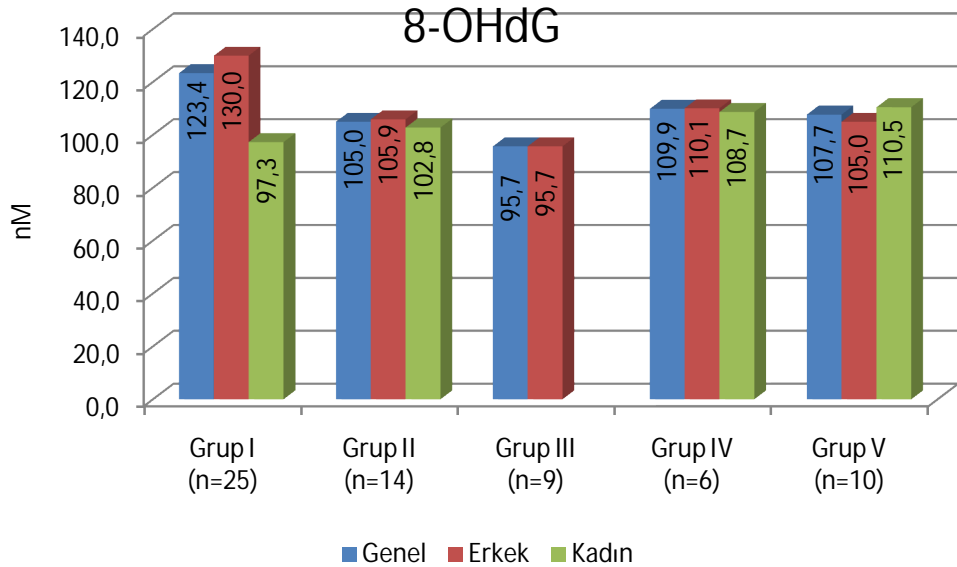
#### 4 BULGULAR

Çalışmamızda üriner sistem kanser (prostat, mesane ve/veya böbrek hücreli), benign prostat hiperplazisi (BPH) ve taş rahatsızlığı olan hastalar ile sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda 8-OHdG çalışılmıştır. Çıkan sonuçlar ve idrar kreatinine bölünerek elde edilen değerler ortalama  $\pm$  SD ve ortanca (minimum - maksimum) olarak tablo 10'da verilmiştir. Grafik 3 ve 4'de sırasıyla 8-OHdG ve 8-OHdG / kreatinin ortalamaları gösterilmiştir.

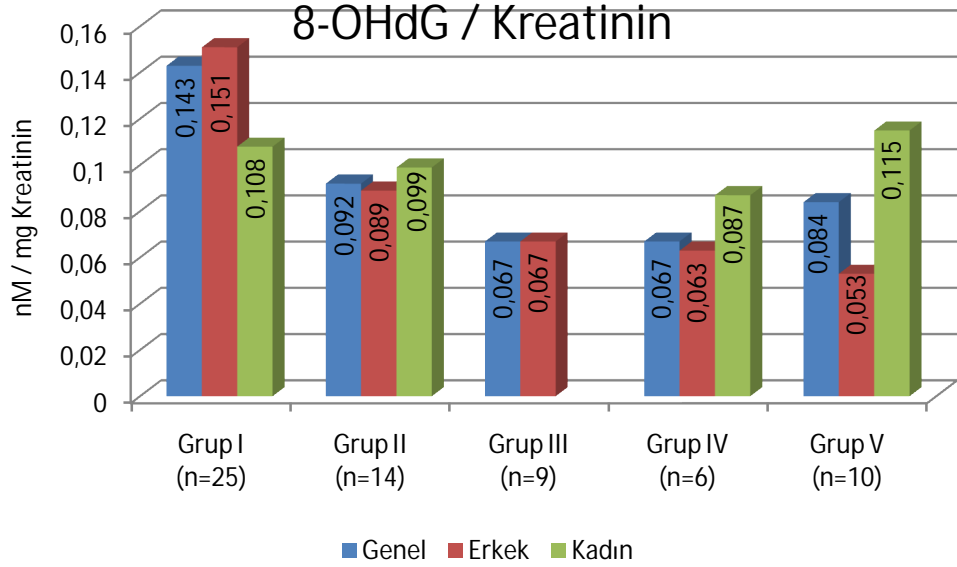
**Tablo 10: Grupların 8-OHdG ve 8-OHdG / Kreatinin değerleri (Ortalama  $\pm$  SD)**

	n	8-OHdG <sup>a</sup>	8-OHdG / Kreatinin <sup>b</sup>
<b>Grup I</b>	25	123,4 $\pm$ 48,8 106,1 (85,8 – 279,2)	0,143 $\pm$ 0,097 0,115 (0,057 – 0,428)
<b>Grup II</b>	14	105,0 $\pm$ 12,7 100,5 (86,2 – 124,2)	0,092 $\pm$ 0,034 0,080 (0,052 – 0,161)
<b>Grup III</b>	9	95,7 $\pm$ 16,5 98,2 (65,8 – 117,0)	0,067 $\pm$ 0,017 0,065 (0,048 – 0,098)
<b>Grup IV</b>	6	109,9 $\pm$ 8,7 109,7 (99,4 – 123,0)	0,067 $\pm$ 0,029 0,064 (0,031 – 0,111)
<b>Grup V</b>	10	107,7 $\pm$ 11,0 110,5 (89,9 – 124,9)	0,084 $\pm$ 0,036 0,073 (0,039 – 0,145)

<sup>a</sup> nM; <sup>b</sup> nM / mg kreatinin



**Grafik 3: Grupların 8-OHdG ortalamaları**



**Grafik 4: Grupların 8-OHdG / Kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması**

8-OHdG ve 8-OHdG / kreatinin seviyeleri için grup I, III, IV ve V kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile incelenmiş ve sonuçlar tablo 11'de gösterilmiştir. Buna göre grup I'in 8-OHdG değerleri grup III'den anlamlı olarak daha yüksektir ( $p < 0,05$ ). Grup I'in 8-OHdG düzeyi IV. ve V. gruba göre göreceli olarak yüksek olmasına rağmen istatistiki bir fark bulunamamıştır. Grup III, IV ve V'in kendi aralarında anlamlı bir fark yoktur. 8-OHdG/kreatinin değerleri incelendiğinde grup I; III, IV ve V. gruba göre anlamlı derecede daha yüksektir ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Grup III, IV ve V'in ise kendi aralarında anlamlı bir fark yoktur.

**Tablo 11: Gruplar arası 8-OHdG ve 8-OHdG/Kreatinin p değerleri**

		n	Grup I	Grup III	Grup IV	Grup V
<b>8-OHdG</b>	Grup I	25	--	0,049 *	0,745	0,985
	Grup III	9		--	0,099	0,072
	Grup IV	6			--	0,664
	Grup V	10				--
		n	Grup I	Grup III	Grup IV	Grup V
<b>8-OHdG/Kreatinin</b>	Grup I	25	--	0,001 *	0,012 *	0,021 *
	Grup III	9		--	1,000	0,514
	Grup IV	6			--	0,448
	Grup V	10				--

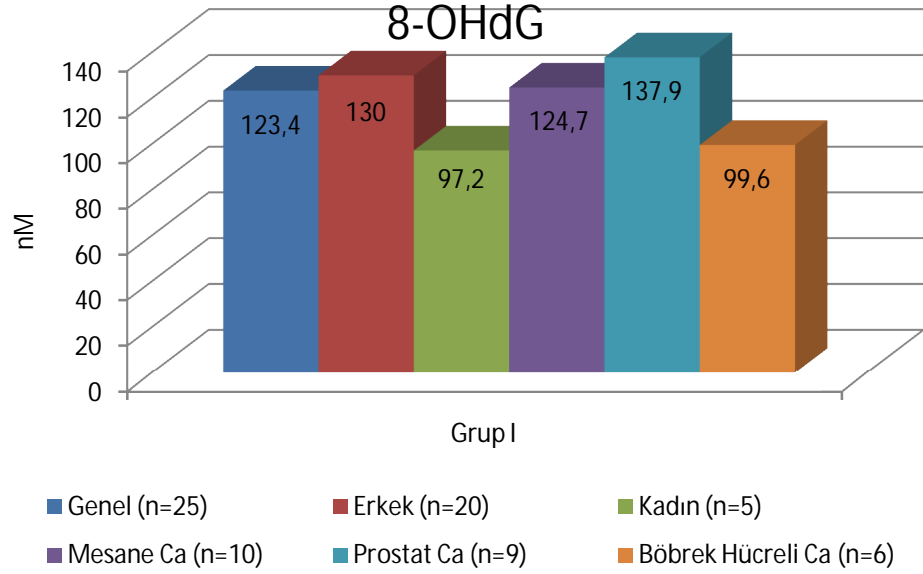
\*İstatistiki olarak anlamlı fark vardır (Mann-Whitney U testi).

Grup I'e ait veriler değerlendirilirken genel ortalama ile erkek ve kadın hastalara ait ortalamalar incelenmiştir. Ayrıca aldıkları tanıya göre ayrı ayrı ortalamaları hesaplanmıştır. 8-OHdG ve 8-OHdG/kreatinin ortalamaları sırasıyla grafik 5 ve 6'de gösterilmiştir. Grup I hastaları aldıkları tanıya göre kendi aralarında ve diğer gruplarla Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar tablo 12'de sunulmuştur. Bu verilere göre mesane kanseri tanısı almış olan hastaların 8-OHdG seviyeleri, BPH ve böbrek hücreli karsinom tanısı almış hastalardan anlamlı olarak daha yüksektir ( $p<0,05$ ). Ancak grup IV ve V'den göreceli olarak yüksek olmasına rağmen istatistiki olarak fark yoktur. Benzer şekilde prostat kanserli hastalarında sonuçları böbrek hücreli karsinom tanısı alan hastalardan, grup IV ve V'den göreceli olarak yüksektir ama istatistiki olarak bir fark yoktur. Mesane ve prostat kanserli hastalar arasında 8-OHdG açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. 8-OHdG/kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında mesane kanserli hastalar; BHK hastaları, grup III, IV ve V'den anlamlı olarak yüksek ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ) iken prostat kanserli hastalarla herhangi bir fark yoktur. Prostat kanserli hastalarda grup III, IV ve V'den anlamlı olarak daha yüksektir, BHK hastalarından göreceli olarak yüksek olmasına rağmen herhangi bir fark bulunamamıştır. BHK hastaların grup III, IV ve V ile arasında istatistiki olarak fark yoktur.

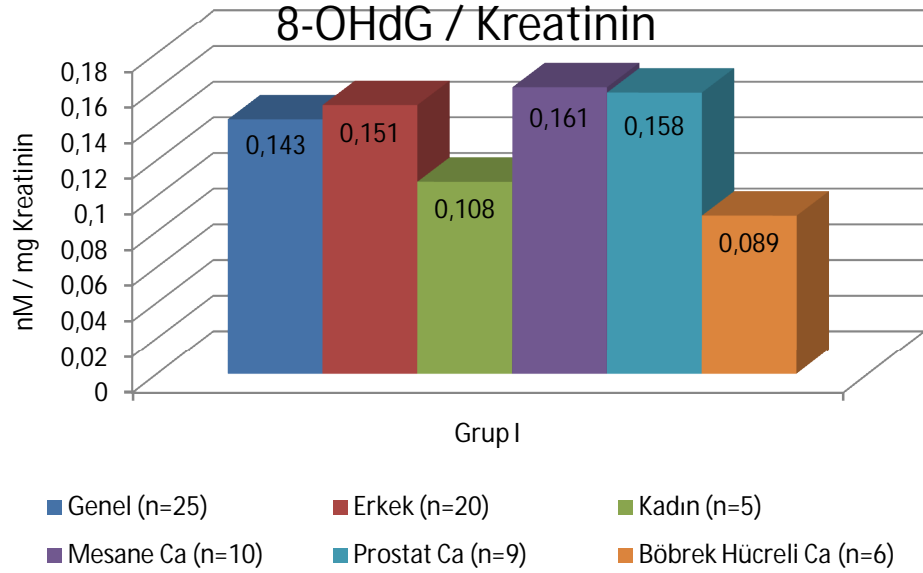
**Tablo 12: Grup I tanıya göre p değerleri**

		n	Mesane ca	Prostat ca	BHK
<b>8-OHdG</b>	Mesane ca	10	--		
	Prostat ca	9	0,624	--	
	BHK	6	0,017*	0,099	--
	Grup III	9	0,022*	0,070	0,814
	Grup IV	6	0,480	0,906	0,055
	Grup V	10	0,384	0,806	0,129
		n	Mesane ca	Prostat ca	BHK
<b>8-OHdG / Kreatinin</b>	Mesane ca	10	--		
	Prostat ca	9	0,514	--	
	BHK	6	0,030*	0,289	--
	Grup III	9	0,001*	0,015*	0,099
	Grup IV	6	0,005*	0,045*	0,262
	Grup V	10	0,013*	0,050*	0,515

\*İstatistiki olarak anlamlı fark vardır (Mann-Whitney U testi).



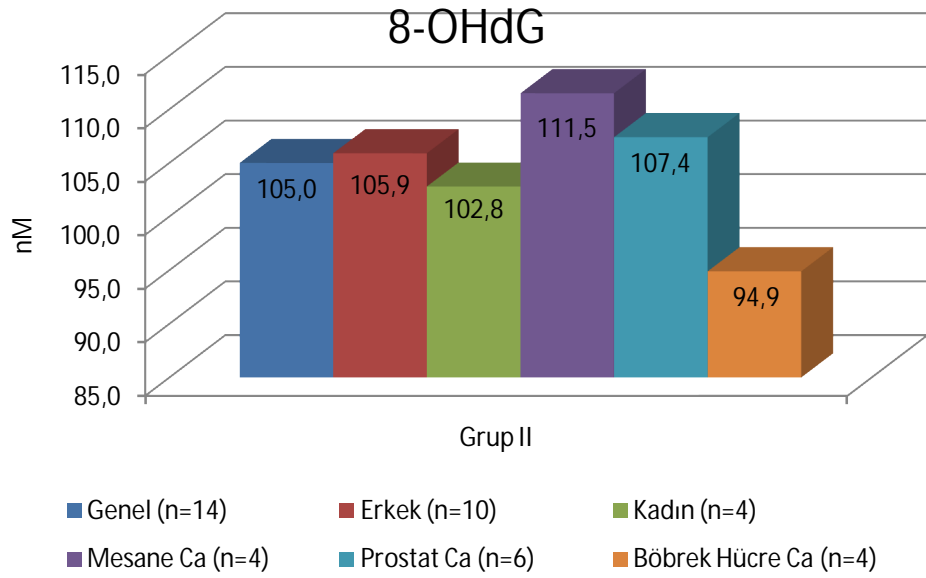
**Grafik 5: Grup I 8-OHdG ortalamaları**



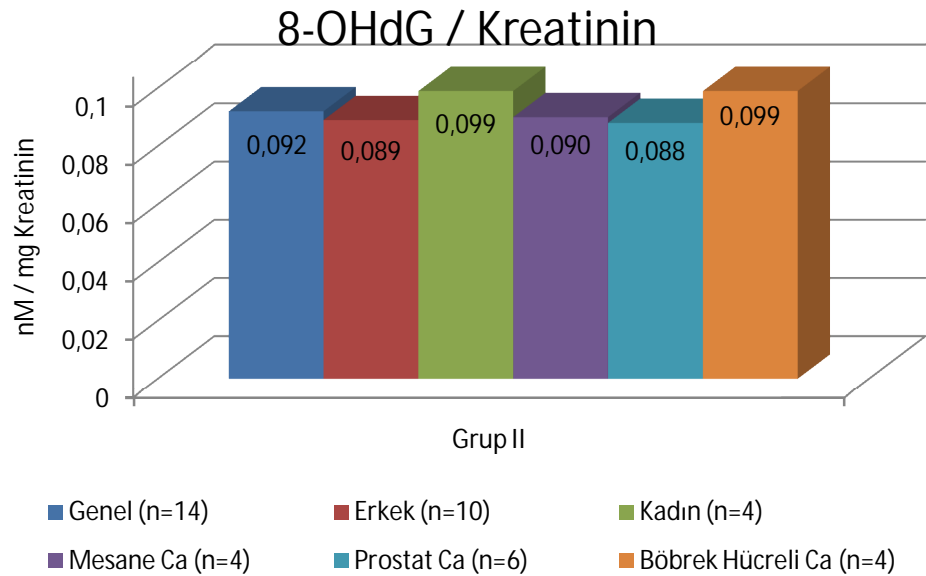
**Grafik 6: Grup I 8-OHdG / Kreatinin ortalamaları**

Çalışmamıza katılan 25 tane kanser tanısı almış grup I hastadan 14 tanesinin ameliyat sonrası örneklerini toplayabilmek mümkün olmuştur. Bu 14 hasta grup II'yi oluşturmuştur. Veriler genel ortalama, erkek ve kadın hastaların ortalamaları ile aldıkları tanıya göre olmak üzere değişik şekillerde incelenmiştir. Grup II'ye ait 8-OHdG ve 8-OHdG/kreatinin ortalamaları sırasıyla grafik 7 ve 8'da gösterilmiştir. Ayrıca

bu hastaların tedavi öncesi ve sonrası 8-OHdG ve 8-OHdG/kreatinin değişimi sırasıyla grafik 9 ve 10'da; ortalama  $\pm$  SD değerleri, ortanca (minimum – maksimum) ve Wilcoxon istatistik sonuçları tablo 13'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre tedavi sonrası 8-OHdG seviyeleri 14 hastanın 8'inde azalırken 6 tanesinde yükselmiştir. Tedavi sonrası 8-OHdG düzeyi göreceli olarak azalmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı değildir. Ancak 14 hastanın 12 tanesinde (%85,7) 8-OHdG/kreatinin düzeyi azalırken sadece 2 tanesinde yükselmiştir ve bu azalma istatistiki olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ).



**Grafik 7: Grup II 8-OHdG ortalamaları**



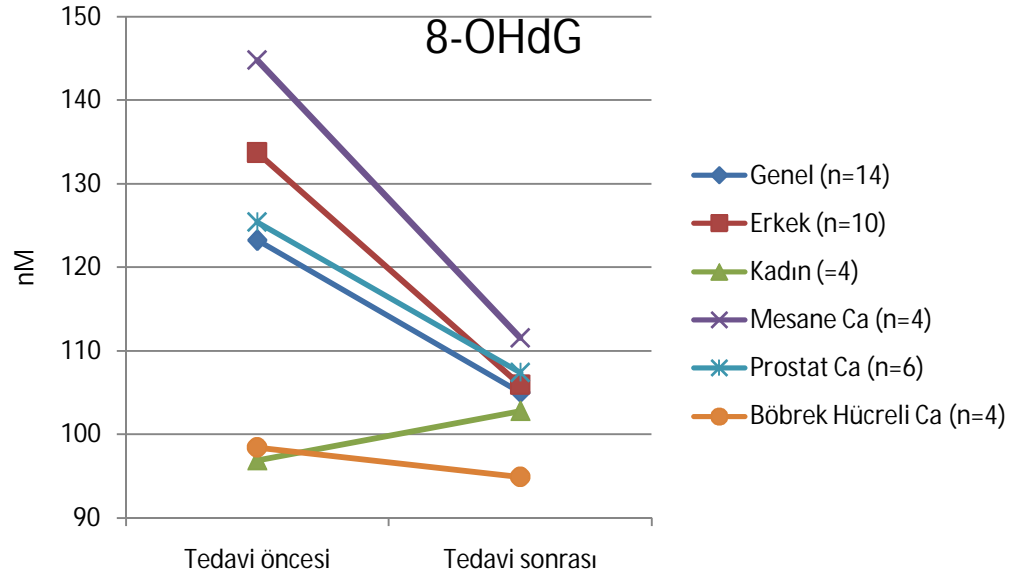
**Grafik 8: Grup II 8-OHdG / Kreatinin ortalamaları**

**Tablo 13: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG ve 8-OHdG/kreatinin ortalamaları**

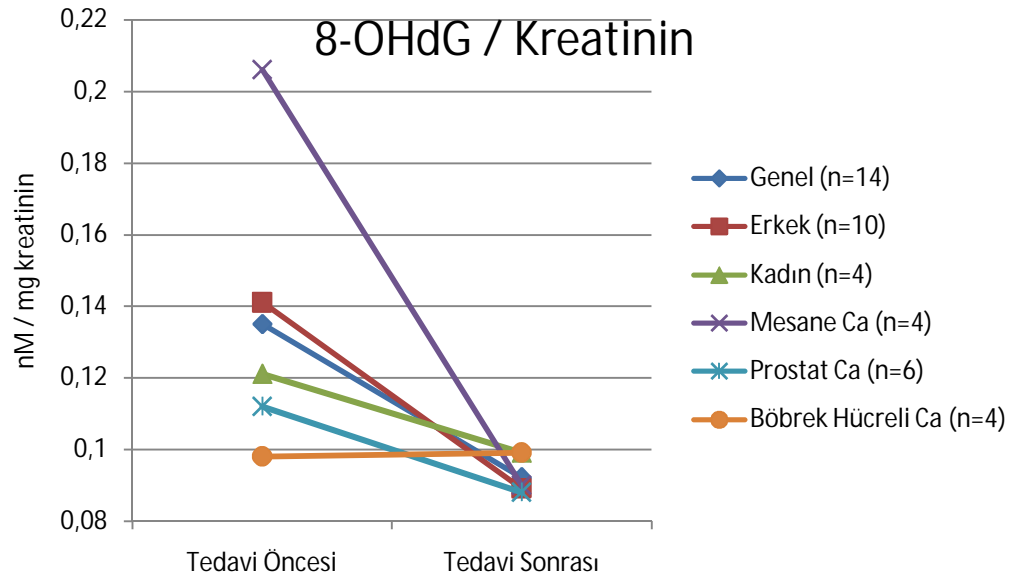
	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	p
<b>8-OHdG<sup>a</sup></b>	123,2 ± 48,0 106,0 (85,8 – 246,4)	105,0 ± 12,7 100,5 (86,2 – 124,2)	0,363
<b>8-OHdG / Kreatinin<sup>b</sup></b>	0,135 ± 0,093 0,110 (0,062 – 0,428)	0,092 ± 0,034 0,080 (0,052 – 0,161)	0,026 *

<sup>a</sup> nM; <sup>b</sup> nM / mg kreatinin

\*İstatistiki olarak anlamlı fark vardır (Wilcoxon testi).



**Grafik 9: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG / Kreatinin düzeyleri**



**Grafik 10: Tedavi öncesi-sonrası 8-OHdG / Kreatinin düzeyleri**

## 5 TARTIŞMA

Bütün canlı organizmalar hayatları boyunca endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanlara maruz kalırlar ve bunun sonucu olarak serbest radikaller üretilir<sup>2</sup>. ROS ve RNS en önemli oksidanlardır ve düşük düzeylerde organizma için faydalı moleküllerdir<sup>4</sup>. Yüksek konsantrasyonlarda ise oksidatif ve nitrosatif stres meydana getirirler ve başta DNA olmak üzere proteinler, lipit ve membranlar gibi hücre bileşenlerine zarar verirler<sup>5</sup>. Hücredeki antioksidan savunma sistemine rağmen hasar hücrenin yaşam döngüsü boyunca birikir ve radikal hasarına bağlı olarak DNA, protein ve lipitlerdeki bozulmalar yaşa bağlı görülen hastalıkların gelişmesinde (kanser, ateroskleroz, artrit, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer durumlar) önemli rol oynar<sup>1</sup>.

ROS hücredeki bütün yapı ve moleküllerle reaksiyona girmesine rağmen DNA ana hedefidir, bu sebeple de yaşlanma ve kanser ile ilişkilidir<sup>76</sup>. ROS; tek veya çift zincir DNA kırığına, pürin ve pirimidinlerde modifikasyonlara, deoksiriboz-fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlantılarına neden olabilir. DNA hasarı transkripsiyonun indüklenmesi veya durması, sinyal yollarının indüklenmesi, replikasyon hataları ve genomik instabilite ile sonuçlanır. Bütün bunlarda karsinogenez ile ilişkilidir<sup>77-80</sup>. DNA'da bulunan dört baz içinden en kolay ve çok reaksiyona giren guanin bazıdır<sup>84-86</sup>. DNA'daki guanin'in •OH radikali ile reaksiyonu sonucu 8-OHdG oluşur. Bu lezyon önemlidir çünkü diğerlerine göre daha kolay oluşur ve mutajeniktir. Bundan dolayı karsinogenez için potansiyel bir belirteçtir. DNA mutasyonu karsinogenez için kritik bir adımdır ve artmış oksidatif DNA lezyonu değişik tümörlerde gözlenmiştir<sup>67</sup>.

Reaktif türlerin in vivo DNA'da hasar meydana getirdiği kararlı hal "steady-state" durumundaki tüm aerobik hücrelerde gösterilmiştir<sup>192-198</sup>. Bu hasarın bir kısmından da •OH radikali sorumludur<sup>192,193,199,200</sup>. İn vivo oluşan bu DNA hasarını tamir edecek çoklu enzim sistemleri vardır ve bu sistemlerde oluşabilecek bir hasar mutasyon sıklığını arttırabilir<sup>201-207</sup>. Bir çok araştırmacı idrardaki 8-OHdG ölçümünü tüm vücut oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak kullanmaktadır<sup>196,208-211</sup>. Ancak 8-OHdG sadece hasarlı DNA'dan kaynaklanmaz. DNA yapımında kullanılan nükleotid havuzundaki okside guanin'in hidrolizi sonucu da oluşabilir ve bu nedenle DNA yapımına da giremez<sup>205</sup>.

8-OHdG düzeyi DNA'daki oluşum ve onarım arasındaki dengeyi de gösterir. 8-OHdG düzeyi sadece oksidatif DNA hasarında değil aynı zamanda tamir hızının azaldığı durumlarda da artar<sup>93</sup>. 8-OHdG dışında idrarda bir çok DNA baz hasarı ürünü bulunmaktadır; 8-hidroksiadenin, 8-hidroksiguanin ve 7-metil-8-hidroksiguanin bunlardan bazılarıdır<sup>212</sup>. Bunların bir kısmı (en çok 8-hidroksiguanin) diyetle alınır.

Özellikle gıdaların pişirilmesi sırasında DNA oksidasyona uğrayabilir ve gastrointestinal sistemde (GIS) DNA hidrolizinden sonra okside baz absorbe edilebilir. Ancak idrardaki 8-OHdG diyetten etkilenmez, çünkü nükleozidler normal şartlarda GIS'den emilmezler<sup>93</sup>.

8-OHdG seviyeleri her zaman DNA'daki guanin rezidüsünün oksidatif hasarının göstergesi değildir. 8-OHdG düzeyi hücrenin redoks durumundan etkilenir ve reaktif türler bunu açığa çıkartır. DNA, •OH, ONOO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>Cl ve HOCl gibi reaktif türlerden etkilenir ve pek çok ürün meydana gelir. Son üç türün ana ürünü 8-OHdG değildir<sup>213-216</sup>. ONOO<sup>-</sup> ve HOCl, DNA'da önceden oluşmuş 8-OHdG'yi yok edebilir. Çünkü hidroksile guaninler, guanininin kendisinden daha kolay okside olabirler.

Bütün bunlara rağmen tersini gösteren çalışmalar da vardır. 8-OHdG seviyelerinde değişme olmaksızın oksidatif DNA hasarı meydana gelebilir hatta hasar artarken 8-OHdG seviyeleri düşebilir<sup>217,218</sup>. Örneğin C vitamini verilen sağlıklı gönüllülerin lenfosit DNA'larında 8-OHdG seviyeleri azalırken 8-hidroksiadenin seviyeleri artmıştır<sup>217</sup>.

Hücrede bir günde 200 kadar guanin modifikasyonu olur<sup>208</sup>. Ancak normal şartlarda bu lezyonlar hızlı bir şekilde tamir edilir. Oksidatif guanozin modifikasyonu ile tamir mekanizması arasındaki dengenin yaşla beraber bozulmasına bağlı olarak 8-OHdG birikebilir. Bazı araştırmacılar yaşla ilişkili olarak baz hasarının arttığını bulurken<sup>219-222</sup> diğerleri 8-OHdG seviyelerinde değişim bulamamış veya azalma tespit etmiştir<sup>208,223,224</sup>. Bundan başka değişik organlarda farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bir veya birkaç organda 8-OHdG hasarı artarken diğerlerinde tamir mekanizması daha aktiftir ve DNA modifikasyonu izlenmemiştir<sup>221,225</sup>. Nükleer DNA'daki oksidatif stres organ spesifik ve yaşa bağlıdır<sup>225</sup>. Ayrıca enerji metabolizmasından dolayı mtDNA ROS hasarına daha fazla maruz kalır. Bununla beraber mitokondrial fonksiyon bozukluğunun yaşlanma sürecindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır<sup>221</sup>.

Yaşam tarzı ve vücut yapısı idrar 8-OHdG seviyelerini çeşitli şekillerde etkiler. Sigara, kilo, çalışma şartları ve egzersiz ile 8-OHdG seviyeleri arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sigara kullanan kişilerde kullanmayan ve/veya ara sıra kullananlara göre oksidatif hasar daha fazladır. Zor çalışma şartlarında (aşırı fizik gücü gerektiren ve gece-gündüz vardiyalı işlerde çalışanlarda) ve mental stres altındaki kişilerde de 8-OHdG seviyeleri yüksektir. Buna karşılık orta derecede spor yapanlarda (<5 saat/hafta) egzersiz yapmayanlar ve ağır egzersiz yapanlara göre oksidatif hasar daha azdır. Buna ek olarak yüksek vücut kitle indeksine (BMI) sahip kişilerde zayıf insanlara göre daha düşük 8-OHdG seviyeleri bulunmuştur<sup>226,227</sup>.



8-OHdG değişik laboratuarlarda değişik metotlarla çalışılmaktadır (HPLC, ELISA, Tandem-Mass spektrometre, immünohistokimyasal yöntemler vb). Bu metotların birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları olmakla beraber en çok kullanılan HPLC ve elektrokimyasal dedektör metodudur. Yalnız 8-OHdG alışması yapan her laboratuvarın temel aldığı 8-OHdG seviyeleri birbirinden farklıdır. 8-OHdG için henüz ortak bir kalite kontrol yöntemi geliştirilmemiştir. Bu nedenle laboratuvarlar ve metotlar arasında ciddi farklar meydana gelebilmektedir<sup>228</sup>.

Bizim alışmamızda idrar 8-OHdG seviyelerini ölçmek için HPLC-ECD metodu kullanılmıştır. Çalışmaya katılan hastalar, hastanede kaldıkları süre boyunca hastane yemekleri yedikleri için benzer bir diyet almışlardır. Aynı şekilde kontrol grubunu oluşturan kişiler hastane personeli olduğu için diyet yönünden fazla bir farklılık gözlenmemiştir. Hastalar ve kontrol grubu sigara kullanmayan kişilerden seçilmiştir.

Bu çalışmada kanserli hastaların bulunduğu grup l'in 8-OHdG/kreatinin seviyeleri hem kontrol grubundan hem de BPH ve taş hastalarından anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır. Buna ek olarak kanser hastalarını kendi içinde gruplayarak değerlendirdiğimizde mesane ve prostat kanserli hastaların idrar 8-OHdG/kreatinin düzeyleri kontrol, BPH ve taş hastalarından anlamlı olarak yüksektir. Benzer bir çalışmada, hem prostat hem de mesane kanserli hastaların 8-OHdG seviyeleri sağlıklı kontrolden daha yüksek bulunmuştur<sup>229</sup>. Bizim alışmamızda BHK hastaları ile kontrol ve diğer gruplar arasında bir fark bulunmamıştır. Ancak bu durum BHK hasta sayımızın az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü Miyake ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada BHK hastalarında 8-OHdG seviyelerini daha yüksek bulmuşlardır<sup>230</sup>. Aynı alışmada 8-OHdG seviyeleri ile tümör boyutu, klinik evresi, uzak metastaz, patolojik evresi, tümör grade evresi ve mikroskopik venöz invazyon arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır. Fakat hastaların cinsiyeti, yaşı ve tümörün histolojik alt grubu ile 8-OHdG arasında bir ilişki bulunmamıştır.

2006 yılında Wada ve ark. mesane ve böbrek kanserli hastalarda mtDNA'nın D-loop bölgesindeki mutasyonları ve doku 8-OHdG içeriğini çalışmışlardır. 8-OHdG seviyeleri radikal sistektomi veya nefrektomi ile çıkarılan örneklerde çalışılmış ve kanserli dokularda yanındaki kanser olmayan dokuya göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur<sup>231</sup>.

Kuo ve ark. (2007) meme kanserli hastalarla yaptıkları çalışmada, idrar 8-OHdG, 8-OHdG/kreatinin ve 8-OHdG/kilo düzeyini çalışmışlar ve üç değeri de meme kanserli hastalarda kontrol grubuna

göre yüksek bulmuşlardır. Ancak hastalar kendi aralarında evre I, II ve III olarak karşılaştırıldığında herhangi bir fark gözlenmemiştir<sup>232</sup>.

2005 yılında değişik kanser grupları ile yapılan bir çalışmada akciğer, jinekolojik ve kolorektal kanserlerde idrar 8-OHdG seviyeleri sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur<sup>233</sup>. Oral skuamöz hücre karsinoma hastalarının tükürük salgısında 8-OHdG çalışılmış ve sağlıklı bireylere göre %65 yükseldiği, ayrıca karbonil düzeylerinde de anlamlı artış olduğu gözlenmiştir<sup>234</sup>.

Cerrahi girişim kanser tedavisindeki önemli yollardan bir tanesidir ve başarısı, takip eden tedavinin etkinliği için de önemlidir. Bizim çalışmamızda da 14 hastaya, hastalığına bağlı olarak standart cerrahi girişimde bulunmuş ve tedavi öncesinde ve sonrasında bu hastalardan idrar 8-OHdG düzeyleri çalışılmıştır. Cerrahi tedavi sonrasında 8-OHdG/kreatinin seviyeleri anlamlı derecede azalmıştır. Yalnız bu grupta mesane, prostat kanseri ve böbrek hücreli karsinom hastaları sayıları az olduğu için ayrı ayrı değerlendirilmemiştir. Benzer bir çalışmada ameliyat olmamış ve olmuş hastalar idrar 8-OHdG seviyeleri bakımından karşılaştırılmış, ameliyat olan hastalarda anlamlı olarak düşme gözlenmiştir. Aynı çalışmada sağlıklı grup ile ameliyat olan hastalar arasında bir fark bulunamamıştır<sup>233</sup>.

2005 yılındaki bir çalışmada mesane kanserli hastalardan transüretal elektro rezeksiyon (TurN) ile ameliyat edilmeden önce ve sonrada 3 kez olmak üzere 4 defa idrar örnekleri alınmış ve 8-OHdG çalışılmıştır. Ameliyat öncesi idrar 8-OHdG seviyeleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Ameliyattan 2 hafta sonraki örneklerde azalma olmasına rağmen istatistiki fark yoktur. 6 hafta sonraki idrar 8-OHdG seviyeleri anlamlı derecede düşmüştür<sup>235</sup>.

## 6 SONUÇ

Çalışmamıza 25 kanserli hasta, 10 sağlıklı kontrol, 9 benign prostat hiperplazisi ve 6 taş rahatsızlığı olan gönüllü katılmış ve 24 saatlik idrar örnekleri toplanmıştır. 25 kanser hastasından ameliyat olan 14 tanesinin ameliyat sonrasında da idrar örnekleri toplanmıştır. İdrar örneklerinde kreatinin ve HPLC-EC metodu ile 8-OHdG çalışılmıştır. 8-OHdG/kreatinin oranları hesaplanmıştır. Gruplar arası istatistiği Mann-Whitney U testi, ameliyat öncesi-sonrası değerlendirmeleri ise Wilcoxon testi ile yapılmıştır.  $p < 0,05$  istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Kanserli hasta grubunun 8-OHdG/kreatinin ortalamaları BPH ( $p < 0.001$ ), taş hastaları ve kontrol grubundan ( $p < 0.05$ ) daha yüksek bulunmuştur. Mesane ve prostat kanserli hastaların 8-OHdG/kreatinin seviyeleri de kontrol grubu, BPH ve taş hastalarından anlamlı olarak daha yüksektir ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubu ile hem BPH hem de taş hastaları arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Ameliyat edilen 14 hastanın 8-OHdG/kreatinin düzeyleri incelendiğinde, 12 tanesinin 8-OHdG/kreatininleri azalırken sadece 2 hastada artış olmuştur. Bu azalma ( $0,135 \pm 0,093$  &  $0,092 \pm 0,034$ ) istatistiki olarak da ( $p < 0,05$ ) anlamlıdır.

Bu sonuçlar bize idrar 8-OHdG/kreatinin değerlerinin kanser hastalarındaki oksidatif DNA hasarını ölçebilecek potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Ayrıca yapılan tedaviye verilen cevabı değerlendirebilmek içinde 8-OHdG takibi yapılabilir. Böylelikle tedavinin bir sonraki aşamasının daha kolay ve etkili planlanması sağlanabilir. Fakat bu ve/veya benzer çalışmalar ileride daha fazla sayıda hasta ile daha uzun süreli planlanmalıdır. Bu sayede hastalığın değişik evrelerindeki tüm etmenlerle olan ilişkisi daha kolay açıklanabilir.

## 7 ÖZET

### Üriner Sistem Kanser Hastalarında Cerrahi Tedavi Öncesi ve Sonrası İdrar 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Seviyeleri

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) DNA lezyonlarında en çok tespit edilen ve çalışılan üründür. Okside DNA, tamir sistemleri ile kendini onarıırken okside bazlar idrar ile atılırlar. İdrar 8-OHdG düzeyleri, kanser gibi dejeneratif hastalıklara bağlı hücrel oksidatif stresi ölçmek için iyi bir belirteçtir.

Çalışmamızda mesane, prostat ve böbrek hücreli karsinomdan (BHK) oluşan hastaların ameliyat öncesi ve sonrası idrar 8-OHdG düzeylerini ölçerek tedavi etkinliğini görmeyi amaçladık. Ayrıca sağlıklı kontrol, benign prostat hiperplazisi (BPH) olan hastalar ile taş rahatsızlığı olan kişileri de karşılaştırma için çalışmaya dahil edildi. Hastalardan toplanan idrarlar yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve elektrokimyasal dedektör (HPLC-EC) ile çalışıldı.

Kanser hastalarından (mesane, prostat ve böbrek hücreli karsinom) oluşan grup l'in ortalama 8-OHdG/kreatinin seviyeleri ( $0,143 \pm 0,097$ ) sırasıyla kontrol, BPH ve taş hastalarından daha yüksek bulunmuştur ( $0,084 \pm 0,036$ ,  $0,067 \pm 0,017$ ,  $0,067 \pm 0,029$ ,  $p < 0,05$ ). Kontrol grubu ile BPH ve taş hastaları arasında ise bir fark bulunamamıştır. Ayrıca mesane ve prostat kanserli hastalarında 8-OHdG/kreatinin seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksektir ( $p < 0,05$ ). Ameliyat olan 14 hastadan 12 tanesinde (%85,7) 8-OHdG/kreatinin azalmıştır ve bu düşüş istatistiki olarak anlamlıdır ( $0,135 \pm 0,093$  &  $0,092 \pm 0,034$ ,  $p < 0,05$ ).

Bizim bulgularımıza göre 8-OHdG/kreatinin değerleri, kanser hastalarında oluşan oksidatif DNA hasarını ölçebilecek potansiyel bir belirteçtir. Ayrıca cerrahi tedavi sonrasında bakılacak 8-OHdG/kreatinin seviyeleri tedavinin ne kadar etkili olduğunu gösterebilir.

## 8 SUMMARY

Urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine in patients undergoing surgery for urological cancer

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is the most frequently detected and studied DNA lesion. Upon DNA repair, 8-OHdG is excreted in the urine. Urinary 8-OHdG is now considered as a biomarker of generalized, cellular oxidative stress and is linked to degenerative diseases including cancer.

In this study it is aimed to analyze efficiency of assaying urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing surgery for urological cancer (bladder, prostate and renal cell cancer (RCC)). We have also assay groups including benign prostatic hyperplasia (BPH), healthy control and the patients with renal stone. Urinary samples were studied with high-performance liquid chromatography and electrochemical detector (HPLC-EC).

Group 1 included cancer patients (bladder, prostate and RCC) with an average of 8-OHdG/creatinine rate ( $0,143 \pm 0,097$ ) is sequentially found to be higher than control, BPH and renal stone groups ( $0,084 \pm 0,036$ ,  $0,067 \pm 0,017$ ,  $0,067 \pm 0,029$ ,  $p < 0,05$ ). On the other hand, no significant difference is observed within control group, BPH and renal stone patients. Furthermore, bladder and prostate cancer patients' 8-OHdG/creatinine rates has found to be higher than control group ( $p < 0,05$ ). Within 14 patients undergoing surgery 12 (85,7%) had decreasing values of 8-OHdG/creatinine rates, indicating a statistical significance ( $0,135 \pm 0,093$  &  $0,092 \pm 0,034$ ,  $p < 0,05$ ).

As a result of our findings, it is concluded that 8-OHdG/creatinine rates are potential biomarkers for detecting oxidative DNA damage in cancer patients. 8-OHdG/creatinine rates can also be used as an indicator of surgical therapy.

## 9 KAYNAKLAR

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> edn. Oxford: Oxford Science Publications; 1999.
2. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724
3. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306: 1-17.
4. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56
5. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1163-1182
6. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr* 1996;16; 33-50
7. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 79-110
8. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2495-2505
9. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 222-230
10. Li CY, Jackson RM. Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol – Cell Physiol* 2002; 282: C227-C241
11. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-277
12. Gupta M, Dobashi K, Greene EL, Orak JK, Singh I. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub-cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997; 176: 337-347
13. Klaunig JE, Xu Y, Bachowski S, Jiang J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis, in: Wallace KB (ed) *Free Radical Toxicology*, Taylor & Francis, London, 1997, pp 375-400
14. Desideri A, Falconi M. Prokaryotic Cu,Zn superoxidies dismutases. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1322-1325
15. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell-survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1994;17: 235-248
16. Valko M, Horris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1161-1208
17. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of OH•- in-vitro and in-vivo. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 29-33
18. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view. *Redox report* 2002; 7: 55-57

19. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* 2000; 304: 55-68
20. Burcham PC. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 1998;13: 287-305
21. Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 1995; 30: 277-290
22. Archer S. measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7: 349-360
23. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615
24. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865-1874
25. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12: 773-790
26. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 190-195
27. Nitric oxide synthase [online] 2007 [cited 30 July 2007] Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Nitric\\_oxide\\_synthase](http://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide_synthase)
28. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein functions by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4928-4944
29. Chiueh CC. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 1999;890: 301-311
30. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species – reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716-1723
31. Leonard SS, Harris GK, Shi XL. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Rad Biol Med* 2004; 37: 1921-1942
32. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal-ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 321-336
33. Pekarkova I, Parara S, Holecek V, Stopka P, Trefil L, Racek J, Rokyta R. Does exogenous melatonin influence the free radicals metabolism and pain sensation in rat? *Physiol Res* 2001; 50: 595-602
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Telser J. Mutual effect of free radicals, redox metals and antioxidants. *FEBS* 2006
35. Chen F, Ding M, Castranova V, Shi XL. Carcinogenic metals and NF-kappa B activation. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 159-171
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal-ions in human-disease –an overview. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85
37. Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001; 79: 225-236

38. Siah CW, Trinder D, Olynyk JK. Iron overload. *Clin Chim Acta* 2005; 358: 24-36
39. Ullen H, Augustsson K, Gustavson C, Steineck G. Supplementary iron intake and risk of cancer: reversed causality? *Cancer Lett* 1997; 114: 215-216
40. Daniel KG, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Copper storage disease: Menkes, Wilson's and cancer. *Front Biosci* 2004; 9: 2652-2662
41. Olivares M, Pizarro F, Speisky H, Lonnerdal B, Uauy R. Copper in infant nutrition: safety of World Health Organization provisional guideline value for copper content of drinking water. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 251-257
42. Coates RJ, Weiss NS, Daling JR, Rettmer RL, Warnick GR. Cancer risk in relation to serum copper levels. *Cancer Res* 1989; 49: 4353-4356
43. Wu TJ, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smith E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 195-201
44. Dayan AD, Paine AJ. Mechanism of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Human Exp Toxicol* 2001; 20: 439-451
45. Kasprzak KS. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest* 1995; 13: 411-430
46. Cieslak-Golonka M. Toxic and mutagenic effects of chromium (VI). A review. *Polyhedron* 1996; 15: 3667-3689
47. Bucher JR, Hailey JR, Roycroft JR, Haseman JK, Sills RC, Grumbein SL, Mellick PW, Chou BJ. Inhalation toxicity and carcinogenicity studies of cobalt sulfate. *Toxicol Sci* 1999; 49: 56-67
48. Nackerdien Z, Kasprzak KS, Rao G, Halliwell B, Dizdaroglu M. Nickel(II)-dependent and cobalt(II)-dependent damage by hydrogen-peroxide to the DNA bases in isolated human chromatin. *Cancer Res* 1991; 51: 5837-5842
49. Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 2022; 127: 47-54
50. Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. Cobalamin (coenzyme B-12): synthesis and biological significance. *Ann Rev Microbiol* 1996; 50: 137-181
51. Crans DC, Smee JJ, Daidamauskas E, Yang LQ. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev* 2004; 104: 849-902
52. Galan A, Garcia-Bermejo L, Troyano A, Vilaboa NE, Fernandez C, de Blas E, Aller P. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducer (cadmium, heat, X-rays). *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 312-320



53. Watanabe W, Henmi K, Ogawa K, Suzuki T. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 2003; 134: 227-234
54. Yamanaka K, Takabayashi F, Mizoi M, An Y, Hasegawa A, Okada S. Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice lead to an increase 8-oxo-2'-deoxyguanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 66-70
55. Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K, Zhitkovich A, Christie NT, Costa M. Carcinogenic nickel silences gene-expression by chromatin condensation and DNA methylation – a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2547-2557
56. Barceloux DG. Nickel. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37: 239-258
57. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen PE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 202-226
58. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401: 1-11
59. Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trans Mol Med* 2005; 11: 571-578
60. Storz P, Doppler H, Toker A. Protein kinase C $\delta$  selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF- $\kappa$ B in oxidative signaling. *Mol Cell Biol* 2004; 11: 571-578
61. Pervaiz S, Clement MV. Tumor intracellular redox status and drug resistance: serendipity or a causal relationship? *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1969-1977
62. Akram S, Teong HF, Fliegel L, Pervaiz S, Clement MV. Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers. *Cell Death Differ* 2006; 13: 628-641
63. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81-128
64. Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res-Fund Mol Mech Mutagen* 1999; 424: 83-95
65. Pinchuk I, Schnitzer E, Lichtenberg D. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta-Lipids Lipid Metab* 1998;1389: 155-172
66. Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650

67. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Inter* 2006;160: 1-40
68. Stadtman ER. Role of oxidants species in aging. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1150-1112
69. Chapman ML, Rubin BR, Gracy RW. Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; 16: 15-19
70. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 347-353
71. Gladstone IM, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* 1994; 93: 764-768
72. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2696-2701
73. Uchida K, Toyokuni S, Kishikawa S, Oda H, Hiaia H, Stadtman ER. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* 1994; 33: 12487-12494
74. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related disease. *Ann New York Acad Sci* 2001; 928: 22-38
75. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1495-1502
76. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* 1991; 250: 3-16
77. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 225-242
78. Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 211-216
79. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21: 361-370
80. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214
81. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327: 77-79
82. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991; 349: 431-434

83. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-172
84. Ravanat JL, Cadet J. Reaction of singlet O<sub>2</sub> with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chem. Res Toxicol* 1995; 8: 379-288
85. Epe B. Genotoxicity of singlet O<sub>2</sub>. *Chem. Biol Interact* 1992; 80: 239-260
86. Mori T, Tano K, Takimoto K, Utsumi H. Formation of 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine in DNA by riboflavin mediated photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 98-101
87. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 1102-1115
88. Dizdaroglu M. Gas-chromatography mass-spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Methods Enzymol* 1990; 193: 842-857
89. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9697-9701
90. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* 4<sup>th</sup> edn. Oxford: Clarendon Press; in the press
91. Sawa T, Ohshima H. Nitritative DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2006; 13: 628-641
92. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria and cell death. *IUBMB Life* 2001; 52: 189-195
93. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogenesis. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Res* 1999; 443: 37-52
94. Fraga CG, 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: 4533-4537
95. Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biol* 2004; 37: 1694-1702
96. Loeb LA. Endogenous carcinogenesis: molecular oncology into the 21<sup>st</sup> century – Presidential address. *Cancer Res* 1989; 49:5489-5496
97. Wiseman H, Halliwell B. damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species – role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29
98. Feig DI, Loeb LA. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase β. *Biochemistry* 1993; 32: 4466-4473
99. Burdon RH, Aliangana D, Gill V. Endogenously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-21 cell proliferation. *Free Radical Res* 1994;21: 121-134

100. Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR et al. detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 1994; 265: 1580-1582
101. El Ghissassi F, barbin A, Nair J, Bartsch H. Formation of 1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenine and 3,*N*<sup>4</sup>-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem Res Toxicol* 1995; 8: 278-283
102. Douki T, Ames BN. An HPLC-EC assay for 1,*N*<sup>2</sup>-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes. *Chem. Res Toxicol* 1994; 7: 511-518
103. Taguchi T, Ohashi M. Changes in fidelity levels of DNA polymerases  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 and  $\beta$  during aging in rats. *Mech Age Dev* 1997; 99: 33-47
104. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 2000; 408: 239-247
105. Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 2005; 11: 1278-9
106. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 2000; 29: 323-333
107. Tang SY, Whiteman V, Jenner A, Peng ZF, Halliwell B. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratogeomys cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: the role of reactive oxygen species and calcium. *Free Radical Biol Med* 2004; 36: 1588-1611
108. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 2006; 66: 3963-3966
109. Lamberth JD. NOX enzymes and the biology of the reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189
110. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005; 10: 1881-1896
111. Savaraj N, Wei Y, Unate H, Liu PM, Wu CJ, Wangpaichitr M, Xia D, Xu HJ, Hu SX, Tien Kou M. Redox regulation of matrix metalloproteinase gene family in small cell lung cancer cells. *Free Radical Res* 2005; 39: 373-381
112. Mori K, Shibamura M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7464-7472
113. Oberley TD. Oxidative damage and cancer. *Am J Pathol* 2002; 160: 403-408
114. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005; 436: 123-127
115. Okada F, Kobayashi M, Tanaka H, Kobayashi T, Tazawa H, Iuchi Y, Onuma K, Hosokawa M, Dinauer MC, Hunt NH. The role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived

- reactive oxygen species in the acquisition of metastatic ability of tumor cells. *Am J Pathol* 2006; 169: 294-302
116. van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 728-734
  117. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* 1997; 411: 157-160
  118. Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwan JC, Ng PY, Guo K, Dhakshinamoorthy S, Porter A. AIF suppress chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J* 2005; 24: 2815-2826
  119. Polytarchou C, Hatzia Apostolou M, Papadimitriou E. Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene. *J Biol Chem* 2005; 280: 40428-40435
  120. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995; 358: 1-3
  121. Szatrowski TP, Nathan CF. production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-798
  122. Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, Keatin MJ, Huang P. Free radical stress in chronic lymphocyte leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 2003; 101: 4098-4104
  123. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255
  124. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004; 567: 1-61
  125. Siomek A, Rytarowska A, Szaflarska-Poplawska A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Czerwionka-Szaflarska M, Olinski R. *Helicobacter pylori* infection is associated with oxidatively damaged DNA in human leukocytes and decreased level of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Carcinogenesis* 2006; 27: 405-408
  126. Neeley WL, Essigmann JM. Mechanism of formation, genotoxicity and mutation of guanine oxidation products. *Chem. Res Toxicol* 2006; 19: 491-505
  127. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair and mutagenesis. *Free Radical Biol Med* 2002; 33: 450-456
  128. Sanchez M, Torres JV, Tormos C, Iradi A, Muniz P, Espinosa O, Salvador A, Rodriguez-Delgado J, Fandos M, Saez GT. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett* 2006; 233: 28-35

129. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Krischmann DA. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 11429-11436
130. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updates* 2004; 7: 97-110
131. Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidase: host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004; 279: 51715-51718
132. Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, Harris RJ, Cawley JC, Allsup DJ, Slupsky JR, Krause KH, Zuzel M. Expression and activity NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *J Immunol* 2005; 175: 8424-8430
133. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 719-724
134. Madhusudan S, Middleton MR. the emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 603-617
135. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Furuichi M, Sakumi K. the defense mechanism in mammalian cells against oxidative damage in nucleic acid and their involvement in the suppression of mutagenesis and cell death. *Free Radical Res* 2004; 38: 423-429
136. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Boil Chem* 2006; 387: 373-379
137. Cooke MS, Rozalski R, Dove R, Gackowski D, Siomek A, Evans MD, Olinski R. Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. *Boil Chem* 2006; 387: 393-400
138. Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M, Sekiguchi M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1 and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6: 86-95
139. Matsukura S, Miyazaki K, Yakushiji H, Ogawa A, Chen Y, Sekiguchi M. Combined loss of expression of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and hMLH1 accelerates progression of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2003; 82: 194-200
140. Weydert CJ, Waugh TA, Ritchie JM, Iyer KS, Smith JL, Li L, Spitz DR, Oberley LW. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radical Biol Med* 2006; 41: 226-237
141. Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 143-148
142. Wang M, Kirk JS, Venkataraman S, Domann FE, Zhang HJ, Schafer FQ, Flanagan SW, Weydert CJ, Spitz DR, Buettner GR et al.

- Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 2005; 24: 8154-8166
143. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biol Med* 2004; 36: 718-744
  144. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1005-L1028
  145. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1456-1462
  146. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 459-489
  147. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric-oxide – a physiological messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-237
  148. Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Front Biosci* 2004; 9: 2029-2044
  149. Trosko JE, Ruch RJ. Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Drug Target* 2002; 3: 465-482
  150. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Br Med Bull* 1993, 49: 523-544
  151. Ames BN, Gold LS. Too many rodent carcinogens – mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 1990; 249: 970-971
  152. Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 201-209
  153. Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 43-48
  154. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267
  155. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med –JJM* 1996; 74: 297-312
  156. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 30-38
  157. Mates JM, Perez-Gomez C, de Castro IN. antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603
  158. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1034-1053
  159. Sies H, Stahl W, Sevanian A. nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005; 135: 969-972

160. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 60409-60455
161. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 365-379
162. Baird WM, Mahadevan B. The uses of carcinogen-DNA adduct measurement in establishing mechanism of mutagenesis and in chemoprevention. *Mutat Res* 2004; 549: 1-4
163. Hwang E. Determination of oxidative DNA damage in cancer research: biological significance and methods of analysis. *Food Sci Biotechnol* 2004; 13: 253-261
164. Hoelzl C, Bichler J, Ferik F, Simic T, Nersesyan A, Elbling L, Erlich V, Chakraborty A, Knasmuller S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 (Suppl. 2): 49-64
165. Kanabrocki EL, Ryan MD, Murray D, Jacobs RW, Wang J, Hurder A, Friedman NC, Siegel G, Eladasari B, Nemchauskyy BA, Cornelissen G, Halberg F. Circadian variation in multiple sclerosis of oxidative stress marker of DNA damage. A potential cancer marker? *Clin Ter* 2006; 157: 117-122
166. Bartsch H, Nair J. oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 385-391
167. Svoboda P, Maekawa M, Kawai K, Tominaga T, Savela K, Kasai H. Urinary 8-hydroxyguanine may be a better marker of oxidative stress than 8-hydroxydeoxyguanosine in relation to the life spans of various species. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 985-992
168. Ikeda S, Biswas T, Roy S, Izumi T, Boldogh I, Kurosky AH, Sarker H, Seki S, Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *J Biol Chem* 1998; 273: 21585-21593
169. Liu X, Roy R. Truncation of amino-terminal tail stimulates activity of human endonuclease III (hNTH1). *J Mol Biol* 2002; 321: 265-276
170. Yang N, Galick H, Wallace SS. Attempted base excision repair of ionizing radiation damage in human lymphoblastoid cells produces lethal and mutagenic double strand breaks. *DNA Repair (Amst.)* 2004; 3: 1323-1334
171. Faure V, Sapparbaev M, Dumy P, Constant JF. Action of multiple base excision repair enzymes on the 2'-deoxyribonolactone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 1188-1195
172. Their R, Bruning T, Kocher K, Blaszkewicz M, Makropoulos V, Sunberg A, Bolt HM. Determination of urinary thymidine glycol using affinity chromatography, HPLC and post-column reaction detection: a



- biomarker of oxidative DNA damage upon kidney transplantation. Arch Toxicol 1999; 73: 479-484
173. Makropoulos W, Kocher K, Heintz B, Schwarz ER, Mertens PR, Stefanidis I. Urinary thymidine glycol as a biomarker for oxidative stress after kidney transplantation. Ren Fail 2000; 22: 499-510
  174. Asagoshi K, Odawara H, Nakano H, Miyano T, Terato H, Ohyama H, Seki S, Ide H. Comparison of substrate specificities of Escherichia coli endonuclease III and mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates. Biochemistry 2000; 39: 11389-11398
  175. Zang QM, Yonekura S, Takao M, Yasui A, Sugiyama H, Yonei S. DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the hNEIL1 and hNTH1 enzymes in human cells. DNA Repair (Amst.) 2005; 4: 71-79
  176. Ocampo-Hafalla MT, Altamirano M, Basu AK, Chan MK, Ocampo JE, Cummings Jr A, Boorstein RJ, Cunningham RP, Teebor GW. Repair of thymine glycol by hNth1 and hNeil1 is modulated by base pairing and cis-trans epimerization. DNA Repair 2006; 5: 444-454
  177. Fujikawa K, Kamiya H, Yakushiji H, Nakabeppu Y, Kasai H. Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. Nucl Acids Res 2001; 21: 449-454
  178. Xu Y, Hansen WK, Rosenquist TA, Williams DA, Limp-Foster M, Kelley MR. Protection of mammalian cell against chemotherapeutic agents thiotepa 1,3-*N,N*2-bis(2-chloroethyl)-*N*-nitrosourea and mafosfamide using the DNA base excision repair genes Fpg and alpha-hOgg1: implications for protective gene therapy applications. J Pharmacol Exp Ther 2001; 296: 825-831
  179. Wu LL, Chiou C, Chang P, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. Clin Chim Acta 2004; 339: 1-9
  180. Germadnik D, Pilger A, Rüdiger HW. Assay for the determination of urinary 8-OHdG by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography 1997; 689: 399-403
  181. Lengger C, Schoch G, Topp H. a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat. Anal Biochem 2000; 287: 65-72
  182. Weimann A, Belling D, Poulsen HE. Quantification of 8-oxoguanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Nucleic Acids 2002; 30:E7
  183. Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, Takeuchi M et al. 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. Br J Dermatol 1998; 138: 1033-5

184. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; 38: 99-166
185. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1075-1107
186. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111: 58-64
187. McCahy PJ, Harris CA, Neal E. The accuracy of recording of occupational history in patients with bladder cancer. *Br J Urol* 1997; 79: 91-93
188. Sobin DH, Wittekind Ch. editors. TNM classification of malignant tumors 6<sup>th</sup> edn New York: Wiley-Liss 2002
189. European Network of Cancer Registries. Eurocim version 4.0 European indices database V2.3, 730 entity dictionary (2001), Lyon 2001
190. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ et al. The Heidelberg classification of renal cell tumors. *J Pathol* 1997;93: 131-133
191. Jaffe M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt und uber eine neue Reaction des Kreatinins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1886; 10: 391-400.
192. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281: 9-19
193. Spencer JPE, Jenner A, Chimel K, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B. DNA strand breakage and base modification induced by hydrogen peroxide treatment of human respiratory tract epithelial cells. *FEBS Lett* 1995; 374: 233-236
194. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-1450
195. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during - carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 387: 147-163
196. 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 USA* 1998; 95: 288-293
197. Hartwig A. Assessment of oxidative DNA damage by the frequency of formamidopyrimidine glycosylase (FPG) sensitive DNA lesions. In: Aruoma OI, Halliwell B editors. *DNA and Free Radicals. Techniques, Mechanisms and Applications*, St Lucia, OICA International Press, 1998
198. Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC-MS techniques. *Free Radical Res Commun* 1992; 16: 75-87

199. Nackerdien Z, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA base damage in chromatin of  $\gamma$ -irradiated cultured human cells. *Free Radical Res Commun* 1992; 16: 259-273
200. Malins DC, Haimanot R. Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res* 1991; 51: 5430-5432
201. Savva R, McAuley-Hecth K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* 1995; 373: 487-493
202. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 915-948
203. Wilson III DM, Thompson LH. Life without DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12754-12757
204. Bridges BA. *MutY* directs mutation? *Nature* 1995; 375: 741
205. Mo JY, Maki H, Sekiguchi M. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11021-11025
206. Roldan-Arjona T, Wei YF, Carter KC, Klungland A, Anselmino C, Wang RP, Augustos M, Lindhal T. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8016-8020
207. Wood RD. nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 23465-23468
208. Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB et al. 8-hydroxydeoxyguanosine as a urinary marker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40: 391-404
209. Loft S, Velthuis-te Wierik EJM, van den Berg H, Poulsen HE. Energy restriction and oxidative DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 515-519
210. Verhagen V, Poulsen He, Loft S et al. Reduction of oxidative DNA-damage in humans by Brussels sprouts. *Carcinogenesis* 1995; 16: 969-970
211. Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radical Res Commun* 1989; 7: 121-128
212. Stillwell WG, Xu HX, Adkins JA et al. Analysis of methylated and oxidized purines in urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 1989; 2: 94-99
213. Douki H, Cadet J. Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radical Res* 1996; 24: 369-380
214. Spencer JPE, Wong J, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Halliwell B. Base modifications and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinopyridone. *Chem. Res Toxicol* 1995; 9: 1152-1158

215. Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Hypochlorous acid induced base modification in isolated calf thymus DNA. *Chem. Res Toxicol* 1997; 10: 1240-1246
216. Whiteman M, Spencer JPE, Jenner A, Halliwell B. Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 572-576
217. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392: 559
218. Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B, Rice-Evans C. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 293-298
219. Ward WF, Qi W, van Remmen H, Zackert WE, Roberts JL, 2<sup>nd</sup> Rishardson A. Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: Measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 845-847
220. Nekhaeve E, Bodyak ND, Kravtsov Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg J, Khrapko K. Clonally expanded mtDNA mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5521-5526
221. Singh KK. Mitochondria damage checkpoint, aging and cancer. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1067: 182-190
222. Barja G. free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600
223. Satchell JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1575-1588
224. Te Koppel JM, Lucassen PJ, Sakkee AN, Van Asten JG, Ravid R, Swaab DF, Van Bezooijen CF. 8OHdG levels in brain do not indicate oxidative DNA damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17: 819-826
225. Nakae D, Akai H, Kishida H, Kusuoka O, Tsutsumi M, Konishi Y. Age and organ dependent spontaneous generation of nuclear 8-hydroxyguanosine in male fischer 344 rats. *Lab Invest* 200; 80: 249-261
226. Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, Kawanami K, Kawanami S, Kido R, Ikeda M. Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 9-15
227. Mizoue T, Kasai H, Kubo T, Tokunaga S. Leanness, smoking and enhance oxidative DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 582-585

228. ESCODD Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in DNA. *Free Radic Res* 2002; 36: 239-245
229. Chiou C, Chang P, Chan E, Wu T, Tsao K, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 87-94
230. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology* 2004; 64: 1057-1061
231. Wada T, Tanji N, Ozawa A, Wang J, Shimamoto K, Sakayama K, Yokoyama M. Mitochondrial DNA mutations and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine content in Japanese patients with urinary bladder and renal cancers. *Anticancer Res* 2006; 26: 3403-3408
232. Kuo H, Chou S, Hu T, Wu F, Chen D. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphism in breast cancer patients. *Mutation Research* 2007; 631: 62-68
233. Mei S, Yao Q, Wu C, Xu G. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches- capillary electrophoresis and GC/MS: an assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatography B* 2005; 827: 83-87
234. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species and antioxidants profile. *Cancer* 2007; 109: 54-59
235. Kaczmarek P, Blaszczyk J, Fijalkowski P, Sierakowska-Fijalek A, Niemirowicz J, Kasprzak A, Baj Z. Assessment of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations in bladder cancer patients treated with intravesical BCG instillation. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19: 526-528

## 10 ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Adem

**Soyadı:** Ünal

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Acıpayam / Denizli, 15.10.1974

### **Eğitim:**

- Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans (2001)
- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1997)
- Yenişehir Sağlık Meslek Lisesi (Laboratuvar Teknisyenliği) (1992)

### **İş deneyimi:**

- Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Laboratuvar Teknisyeni & Biyolog) (1992 – ...)

**Yabancı Dil:** İngilizce

### **Kurslar:**

- Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler  
27 Ağustos – 03 Eylül 2000 (Ege Üniversitesi & Berlin Teknik Üniversitesi )
- İyi Klinik Uygulamaları ve Klinik Araştırmalarda Temel Prensipler  
8 – 9 Mayıs 2003 (İDE / Ankara)
- Klinik Araştırmalarda Biyoistatistik Uygulamaları  
Şubat – Mart 2004 (İDE / Ankara)
- Etkili İletişim ve Beden Dili  
6 Nisan 2004 (Academy International / Ankara)
- İDE Standart Operating Procedures – İDE SOP  
Nisan 2004 (İDE / Ankara)