ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OTOİMMÜN TİROİD HASTALIĞININ TANI VE TAKİBİNDE OKSİDATİF DNA HASAR BELİRLEYİCİSİ 8-OHdG'NİN ÖNEMİ

İLKNUR ALTUNTAŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OTOİMMÜN TİROİD HASTALIĞININ TANI VE TAKİBİNDE OKSİDATİF DNA HASAR BELİRLEYİCİSİ 8-OHdG'NİN ÖNEMİ

İlknur ALTUNTAŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Eş Danışman: Prof. Dr. Tomris ERBAŞ

Moleküler oksijenin toksik etki göstermesi, oluşturduğu süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve single oksijen gibi reaktif ara ürünler nedeniyledir. Biyolojik sistemlerde moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında oluşan bu ürünlere "reaktif oksijen türevleri" (ROS) denir. ROS'lar iyonize radyasyon, mutagenler, karsinogenler ve aynı zamanda hücrede oksijen metabolizması sırasında üretilir. Oksidatif streste, *in vivo* üretilen ROS'lar, nükleik asitlerin proteinlerin ve lipitlerin oksidatif hasarına neden olur. Oksidasyonda bir hidroksil radikali, guanin molekülünün 8. pozisyonuna eklenir ve oksidasyonla değişikliğe uğratılmış DNA'nın serbest radikal lezyonlarından biri olan 8-OHdG (8-oxo-dG) oluşur. 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğramış DNA, DNA hasarının miktarının belirlenmesinde kullanılır. Reaktif oksijenler, endokrin bezlerinin otoimmün hastalıklarının gelişiminde de rol oynar.

Bu çalışmada, ELISA yöntemi kullanılarak, Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalarındaki 8-OHdG miktarı normal sağlıklı kişilerden oluşan kontrol gurubunun değerleri ile karşılaştırılmış, Hashimoto tiroiditi (grup 1), Graves hastalığı (grup 2) ve kontrollerdeki (grup 3) 8-OHdG değerleri arasında, ANOVA testi ile anlamlı bir fark gösterilememiştir ($p= 0,361$). Bütün bu gruplardan elde edilen serumlardaki serbest T_3, T_4 ve TSH değerleri ile 8-OHdG arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($r= - 0,14751$, $r= - 0,01938$, $r= 0,025623$, $p>0.05$). Toplam 10 hastanın tedavi öncesi ve sonrası 8-OHdG düzeyleri arasındaki fark incelenmiş ve anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p= 0,016$).

2007, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Oksidatif DNA hasarı, 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ABSTRACT

Master Thesis

THE IMPORTANCE OF 8-OHdG, THE OXIDATIVE DNA DAMAGE INDICATOR IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF AUTOIMMUNE THYROIDIT

İlknur ALTUNTAŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Co-Supervisor: Prof. Dr. Tomris ERBAŞ

Molecular oxygen causes toxic effect because of its interval reactive products such as superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen. In biological systems, such products that is produced during reduction of molecular oxygen is called "Reactive oxygen species". ROS are produced by ionizing radiation, mutagenes, carsinogenes and also produced during oxygen metabolism in the cell. In oxidative stress, *in vivo* produced ROS causes oxidative damage in nucleic acids, proteins and lipids. In oxidation, one hydroxyl radical is added to the 8^{th} position of guanine molecule and net result is the formation of 8-OHdG (8-oxo-dG), a free radical lesion of oxidatively changed DNA. Oxidatively changed DNA in the form of 8-OHdG is used for the determination of DNA damage. ROS also have a role in development of otoimmune diseases in endocrine glands.

In patients suffering from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease, the amount of 8-OHdG was compared with control group containing healty peoples by use of ELISA method. There were no meaningful differences in 8-OHdG values between Hashimoto's thyroiditis (grup 1), Graves' disease (grup 2) and control grup (grup 3) as shown by ANOVA test. There were also no significant differences between the free T_3, T_4, TSH values and 8-OHdG (r = - 0,14751, r = -0,01938, r = 0,025623, $p>0.05$) in serum of all these groups. The difference between 8-OHdG values of totally 10 patients before and after treatment was studied there was significant differences in the value of 8-OHdG ($p= 0,016$).

2007, 61 pages

Key Words: Oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

TEŞEKKÜR

"Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi" konulu bu tez çalışması **TUBİTAK** Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'nun (SBAG-AYD-467), 104S078 no'lu projesi ile desteklenmiştir ve "3rd International Conference On Oxidative Stress In Skin Biology and Medicine" isimli konferansta poster olarak sunulmuştur.

Altuntas I, Osmanagaoglu O, Dagdelen S, Isildak M, Durusoy M, Erbas T.
"The importance of 8-OHdG, an oxidative damage indicator, in the diagnosis and treatment of autoimmune thyroiditis".
3rd International Conference On Oxidative Stress In Skin Biology and Medicine
21-24 September, Page 82, Andros, Greece. (2006)

Hep bir yerlere yetişme, bir şeyleri yetiştirme telaşındaydım. Eğitimci bir aileden geliyor olmam, tüm bu telaşların hayatımda mutlaka bir değerinin olacağını vurguladı. Hayatımın her alanında sosyal uğraşlarla ilgilenmem gerektiğinin, attığım her adımda adil ve dürüst olmanın önemini vurgulayan, her zaman yanımda olduklarını hissettirip benimle birlikte aynı yolda yürüdükleri için canım annem Rukiye ALTUNTAŞ'a, canım babam Ahmet ALTUNTAŞ'a, bir tek kardeşim Yılmaz ALTUNTAŞ'a, güzel ve değerli aileme çok teşekkür ederim. Hayatımdaki en değerli şansı sevgili hocam Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'nun Mikrobiyal Genetik laboratuarında projelerinde çalışma fırsatı bularak elde ettim. Danışman konumunun yanı sıra hayatımızın her alanında bizlere arkadaş gibi davrandığı için, bizlerle deneyimlerini, bilgilerini hiç esirgemeden paylaştığı için, birçok anıya birlikte imza attığımız için, hayatımın her anında bir tebessüm, sevgi ve saygıyla anacağım güzellikleri birlikte yaşadığımız için çok değerli hocama çok teşekkür ederim.

Tıbbi bilgisine imrendiğim, bana en iyi şekilde yol gösteren, tez deneylerimde ELISA laboratuarı için beni teşvik eden, tezimde bana eş danışman olan değerli hocam Prof. Dr. Tomris ERBAŞ'a, çok teşekkür ederim. Yüksek Lisans tez konusu belirlenirken bana bu konunun verilmesinde etken olan hocam Prof. Dr. Mübeccel DURUSOY'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımı yaptığım Hacettepe Üniversitesi Biyokimya A.B.D. ELISA laboratuarındaki çalışan biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma her aşamada yardımcı oldukları için çok teşekkür ederim.

Bununla beraber, tezimi destekleyen TUBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubuna, tez savunmamda beni dinleyen ve tezime değerli katkılarda bulunan sevgili Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ ve Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK hocalarıma da çok teşekkür ederim.

Son olarak, sonun başlangıcına kadar her durumda birlikte olacağımıza inandığım, hastalığımda ve sağlığımda, üzüntülerimde, sevinçlerimde beni yalnız bırakmayan, hayatımda çok önemli yerleri olan çok değerli, çok özel sevgili arkadaşlarım Fadime KIRAN'a ve Tuliz YILDIRIM'a, laboratuvarımızdan rüzgar gibi gelip geçen ve bir hoş seda bırakan güzel arkadaşım Tuba ŞİMŞEK'e, sağlam bir destek bildiğim arkadaşım Hasan İŞLER'e, Ankara Üniversitesi İzci Grubu'ndaki arkadaşlarıma ve Motorsporlarındaki arkadaşlarıma verdikleri manevi destek için çok teşekkür ederim.

İlknur ALTUNTAŞ

Ankara, Şubat 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 4
2.1 Serbest Radikaller 5
2.1.1 Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türevleri 7
2.1.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) 8
2.1.1.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2) 8
2.1.1.3 Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) 9
2.1.2 Hücrede reaktif oksijen türevlerinin kaynağı 9
2.1.2.1 İç kaynaklar 9
2.1.2.1.1 Fenton-Haber Weiss reaksiyonu 10
2.1.2.2 Dış kaynaklar 11
2.2 Oksidatif Hasar 13
2.2.1 Lipitlerde oksidatif hasar 13
2.2.2 Proteinlerde oksidatif hasar 14
2.3 DNA'da Oksidatif Hasar ve Klinik Önemi 15
2.3.1 DNA hasarına neden olan etkenler 16
2.3.1.1 Eksojen (çevresel) etkenler 16
2.3.1.2 Endojen (sponten) etkenler 17
2.4 DNA'da Oksidatif Stres İle Oluşan Hasarlar 20
2.4.1 8-OH-Guanin oluşumu 23
2.5 Antioksidan Savunma Sistemi 26
2.6 Oksidatif Hasarın Onarımı 27
2.6.1 Mismatch onarım 28
2.6.2 Baz çıkararak onarım 29
2.6.3 Nükleotid çıkararak onarım 31
2.6.4 Doğrudan onarım 32
2.7 DNA Hasarının Klinik Önemi 33
2.8 Tiroid Bezi 36
2.8.1 Hipertiroidizm ve tirotoksikoz 39
2.8.1.1 Graves hastalığı ve sebebi 39
2.8.2 Hipotiroidizm 40
2.8.2.1 Hashimoto tiroiditi 40
2.9 Oksidatif DNA Hasarı Ölçüm Yöntemleri 41
2.9.1 Kan ve idrar ile atılan DNA hasar ürünlerinin ölçümü 42
2.9.2 ELISA yöntemi 43
2.9.2.1 ELISA bileşenleri 43
2.9.2.2 ELISA yöntemleri 45
2.9.2.2.1 Direkt ELISA 45

2.9.2.2.2 İndirekt ELISA 45
2.9.2.2.2.1 İndirekt yöntemde antijen aramaya yönelik testler..... 45
3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 47
3.1 Materyal..... 47
3.1.1 Hastaların seçimi……47
3.1.2 Hasta sayısı kan örneklerinin alınması ve saklanması…… …47
3.2 Yöntem 47
3.2.1 Serumda 8-OHdG miktarının ölçümü……..……47
4. BULGULAR..... 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 55
KAYNAKLAR 57
EK 1 61
ÖZGEÇMİŞ..... 62

SİMGELER DİZİNİ

ABTS	Azido-benzo-thiazolidin-sulfat
AMP	Adenozin monofosfat
AP	Abazik bölge
BER	Baz çıkararak onarım
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
ELISA	Enzim linked immunosorbent assay
FAPy	Formamidopirimidin
GSH	Glutatyon (redükte)
GST	Glutatyon S-transferaz
GPX	Glutatyon peroksidaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	Horseradish peroksidaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$HO_2^{\bullet}$	Perhidroksil radikali
MDA	Malondialdehit
$NADP^+$	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NER	Nükleotit çıkararak onarım
$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit anyonu
$^{\bullet}OH$	Hidroksil radikali
$^1O_2$	Singlet oksijen
OPD	O-phenylendiamin
$R^{\bullet}$	Alkil radikali
$RCOO^{\bullet}$	Organik peroksil radikali
RNS	Reaktif nitrojen türevleri
$RO^{\bullet}$	Alkoksil radikali
$ROO^{\bullet}$	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türevleri
SOD	Süperoksit dismutaz
ST_3	Serbest triiyodotironin
ST_4	Serbest tiroksin
T_3	Triiyodotironin
T_4	Tiroksin
TMB	3-3', 5-5' tetrametilbenzidin
TRAb	Tiroid reseptör antikoru
TT_3	Total triiyodotironin
TT4	Total tiroksin
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
TRH	Tirotropin salgılayıcı hormon
UV	Ultraviyole
8-OH-Gua	8-hidroksiguanin
8-OH-G	8-hidroksiguanozin
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
8-OH-Ade	8-hidroksiadenin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Serbest radikallerin hücresel fonksiyonlara olan etkisi 12
Şekil 2.2 DNA' da oksidatif hasar ve olası sonuçları 16
Şekil 2.3 Oksidatif stresin hastalıklarla ilişkisi 18
Şekil 2.4 DNA' da replikasyon doğruluğunun korunamaması ve olası sonuçları 19
Şekil 2.5 Hidroksil radikalinin atak yapacağı bölgeler 21
Şekil 2.6 Hidroksil radikalinin guanin ile reaksiyonu 22
Şekil 2.7 DNA baz modifikasyonları 23
Şekil 2.8 Uygun bazların hidrojen bağıyla eşleşmesi 24
Şekil 2.9 Hasarlı bazın yanlış eşleşmesi 25
Şekil 2.10 Guanin'den modifiye baz olan 8-OHdG'nin oluşumu 26
Şekil 2.11 Mismatch onarımı 29
Şekil 2.12 DNA glikozilazın etkisi 30
Şekil 2.13 Baz çıkarma onarımı 31
Şekil 2.14 Nükleotit çıkararak onarım (NER) 32
Şekil 2.15 Hasara en fazla maruz kalan baz 8-OHdG 34
Şekil 2.16 Prostat ve göğüs kanseri olan bireylerde DNA hasarının normal bireylere oranla fazlalığı 34
Şekil 2.17 Meyve suyu (a) ve yeşil çay (b) alımının hasar üzerine olumlu etkileri 35
Şekil 2.18 Arsenik zehirlenmesinin hasar üzerine olumsuz etkisi 35
Şekil 2.19 Tiroid hormonunun salgı mekanizması 38
Şekil 4.1 Standart kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 4.2 Hashimoto (n= 13), Graves (n=7) ve Kontrol grup (n= 15) serumlarında 8-OHdG miktarı (p= 0,361) 53
Şekil 4.3 Serumda serbest T_3 ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = -0,14751) 54
Şekil 4.4 Serumda serbest T_4 ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = -0,01938) 54
Şekil 4.5 Serumda TSH miktarı ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = 0,025623) 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Hasta gruplarının yaş, cinsiyet, tiroid hormon, tiroid otoantikor ve 8- OHdG düzeyleri 52
Çizelge 4.2 Tedavi öncesi ve sonrası tiroid hormon ve 8-OHdG düzeyleri 52

1. GİRİŞ

Aktif oksijen, vücudumuz enerji üretirken ve aynı zamanda makrofaj hücreleri vücuda zarar veren yabancı maddeleri etkisiz hale getirirken üretilir. Biyolojik sistemlerde moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında oluşan bu ürünlere "reaktif oksijen türevleri" (ROS) denir. Aktif oksijen ayrıca, sigara, aşırı alkol kullanımı, aşırı beslenme, ağır egzersiz gibi alışkanlıklarda ve aşırı stres, UV ışını, radyoaktif ışın gibi faktörler altında da vücutta üretilir.

Serbest radikallerin fazlalığı, hücrelere hatta bunların DNA'sına bile zarar veren kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşturacak bir dizi olaya neden olabilmektedir. Normal şartlarda hücrelerde oksidantlar ve antioksidantlar arasında korunan bir denge vardır. Fakat oksidantların aşırı üretimi veya antioksidantların azalışı sonucu oluşan dengesizlik, anormal oksidant sisteme yol açar, böylelikle "oksidatif stres "oluşur. Oksidatif streste, *in vivo* üretilen ROS'lar, nükleik asitlerin proteinlerin ve lipitlerin oksidatif hasarına neden olur.

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. DNA ile hidroksil radikallerinin etkileşimi durumunda radikallerin % 80'i bazlara eklenir ve %20'den daha az bir kısmı da şeker grubundan bir hidrojen atomu alır. DNA'da tüm pürin ve pirimidin bazları arasında guanin oksidasyona daha çok yatkındır. Bu nedenle ROS'un başlıca hedefi ve neden olduğu, en önemli DNA modifikasyonudur. Oksidasyonda bir $^{\bullet}OH$ radikali, guanin molekülünün 8. pozisyonuna eklenir ve oksidasyonla değişikliğe uğratılmış DNA'nın serbest radikal lezyonlarından biri olan 8-OHdG (8-oxo-dG; 8-hidroksi-2′-deoksiguanozin) oluşur. Onarım sırasında 8-OHdG formunda atılan bu nükleotitler DNA'daki hasar miktarının belirlenmesinde kullanılır.

Oksidatif DNA hasarını artıran ajanlar, genellikle kanser gelişimi riskini de artırır. Yapılan çalışmalardaki kanıtlar, malignant hücrelerin yüksek miktarda okside olmuş DNA lezyonları içerdiğini göstermiştir. Oksidasyonla değişikliğe uğratılmış DNA miktarının artışı, insan dokularında özellikle tümörlerde ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca

meme ve akciğer kanserinde 8-OHdG'nin yüksek konsantrasyonu idrarda belirlenmiştir. İnsan vücudunda yaklaşık $5x10^4$ hücrenin her bir DNA'sında birkaç yüz kadar oksidatif hasar olduğu, 24 saatlik idrar çıkarım oranlarına göre tahmin edilmektedir. 8-OHdG, ROS'un DNA'da yaptığı yaklaşık 20 tane oksidatif hasar ürünlerinden biri olup, hem hücre içi oksidatif DNA hasarı hem de onarım seviyesinin göstergesidir. 8-OHdG, ekzonükleazlar olarak adlandırılan enzimlerin okside olmuş DNA'yı onardığında diziden çıkarılır. Oluşan modifiye bazlar idrarla dışarı atılır. İdrardaki 8-OHdG, hücresel oksidatif stres ve bir DNA onarım ürünü olarak önemli bir biyomarkerdır. 8-hidroksideoksiguanozin mutasyonu, GC=TA transversiyonlarının kurulmasına neden olarak premutajenik özellik gösterir.

ROS'un DNA'da oluşturduğu ürünlerin kimyasal karakterini ve miktarını belirlemek için, immünokimyasal teknikler, ^{32}P postbeling ölçüm teknikleri, NMR spektroskopisi, gaz kromotografi (GC), yüksek basınçlı likit kromotografi (HPLC) ile radyoaktivite, absorbans ve elektrokimyasal belirleme yöntemleri gibi değişik analitik yöntemler geniş biçimde kullanılmaktadır. Son yıllarda bu hasarın belirlenmesinde, monoklonal antibody üzerine kurulmuş ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi geliştirilmiştir. ELISA yöntemi pahalı araç-gereç gerektirmez, analiz zamanı kısadır, küçük kan veya idrar hacmiyle kolay ölçülebilir bir yöntemdir.

Yapılan referans taramalarında reaktif oksijenler, bazı tiroid hastalıklar gibi endokrin bezlerin otoimmün hastalıklarında da rol oynarlar. Buna bağlı olarak oksidatif DNA hasar belirleyicisi olan 8-OHdG'nin kullanılabileceği planlanmıştır. Tiroid hormonları, bazal metabolizmayı hızlandırır. Hormon miktarındaki artış, oksijen tüketimi ve ısı üretimini artırır. Bu etkiler de bazal metabolik hızdaki artışa katkıda bulunur. Böylece serbest radikal olan süperoksit anyon düzeyleri artar. Bu durum sıçan kalp mitokondrisinde yapılan çalışmada gösterilmiştir. Hipertiroidli hastalarda oksijen tüketim oranının arttığı gösterilmiştir. Bu metabolik durum, serbest radikal üretimindeki ve oksijen toksisitesindeki artış ile sonuçlanacaktır. Hipertiroidli hastalarda serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonunun artması, bu hastalarda serbest radikallerin bu dokularda zarara neden olduğunu göstermiştir. Yukarıdaki verilere bakılırsa

hastalarda 8-OHdG miktarı saptanarak, oksidatif stres düzeyinin açığa çıkarılması anlamlı olabilir.

Graves hastalığı en sık görülen otoimmün hastalıklardan biridir ve TSH reseptörlerinin, TSH reseptör antikorları ile uyarılması sonucunda gelişen aşırı tiroid hormon yapımı ile karakterizedir. Graves hastalarında reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve serbest radikal temizleyici sistem ile regülasyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Otoimmün tiroid hastalıklarından olan Hashimoto tiroiditi ise immün sistemin, tiroidin antijenik yapılarına immün yanıt oluşturması ile ortaya çıkmaktadır. Sık olarak görülen bu iki otoimmün tiroid hastalıklarında oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-OHdG ilk kez çalışılmıştır.

Bu çalışmada, bir oksidatif DNA hasar biyomarkerı olan 8-OHdG miktarının ELISA yöntemi kullanılarak Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı olan hastalarda saptanması ve normal sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırılması ve antitiroid tedavinin 8-OHdG üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Oksijen, bütün aerobik organizmalarda solunum ve diğer oksidatif reaksiyonlar için son oksidant olarak gereklidir. Artan oksijen konsantrasyonu canlı organizma için toksik olabilmekte, radikal oluşumunun bu toksisitede etkili olduğu bilinmektedir (Halliwell 2002).

Paralel spinlerde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan serbest radikallerin fazlalığı hücrelere hatta bunların DNA'sına bile zarar veren, kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşturacak bir dizi olaya neden olabilmektedirler (Cooke *et al.* 2003). Bu hasarlar; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleus membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak olarak tanımlanmaktadır.

Biyolojik sistemde reaktif oksijen veya oksijen radikallerinin düzeyi, oksidatif stres olarak tanımlanır. Hidroksil radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır. Demir gibi metal iyonlar varlığında süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin reaksiyona girmesiyle oluşturulur (Haber-Weiss reaksiyonu).

Oksidatif streste *in vivo* üretilen reaktif oksijen türevleri (ROS), DNA'da farklı mekanizmalarla; baz ve şekerlerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere (AP; apürinidik/apirimidinik bölge), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara neden olur. DNA, stabil bir molekül olmasına rağmen yaşam boyunca fizyolojik koşullarda spontan kimyasal oksidatif hasara uğramaktadır. Örneğin, pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilir (Halliwell 2002). ROS tarafından oluşan oksidatif hasar yaşlanma, kanser, kardiovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi

doku fonksiyonlarının bozulması ile karakterize hastalıkların başlıca nedeni olarak görülür. DNA'da oluşan oksidatif hasar, mutagenezisin, karsinogenezisin ve yaşlanmanın göstergesidir (Forlenza and Miller 2006).

DNA hasarının mutlaka kansere yol açması da beklenmemelidir. Düşük düzeylerde hasar, etkin bir şekilde onarıldığından ve yüksek düzeylerde oksidatif hasar ise hücre ölümü ile sonuçlandığından, orta düzeydeki hasarın maligniteye yol açma olasılığı çok yüksektir.

Cu^{+2} (Cupric) iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığı ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir (Cooke *et al.* 2003). Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-OHdG'dir. Modifiye bazlar DNA onarım mekanizmaları (BER=baz çıkararak onarım, NER=nükleotit çıkararak onarım vb.) tarafından dışarıya verilir (Helbock *et al.* 1999).

2.1 Serbest Radikaller

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir. Ayrıca iki elekronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça kararlıdır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur.

Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğer atoma). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar.

Serbest radikaller paralel spinlerde bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektron içerir yani atomik orbitalde tek bir elektron bulunur. Bir ya da birden çok çiftlenmemiş elektronun bulunması o maddenin manyetik bir alana çekilmesine yol açar. Radikal oluştuktan sonra tek elektronunu bir başka moleküle verebilir ya da bir başka molekülden elektron alıp çift hale gelebilir ya da radikal olmayan bir yapıya eklenebilir. Her durumda radikal olmayan yapı radikal hale gelir. Çiftlenmemiş elektronlar, atom ya da molekülü daha reaktif yaparak bunların kimyasal aktivitesini değiştirir. Çiftlenmemiş bu elektron herhangi bir atom ile kolaylıkla birleşebilir.

Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrelere ve hatta bunların DNA'sına bile zarar veren, kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve kanser oluşturacak bir dizi olay meydana gelebilir. Yapılan çalışmalar 1954'ten beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu göstermektedir.

Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur.

Antioksidantlar ise serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Bağlanan iki serbest radikali birleştirerek nötralize edebilme özelliğine sahip bir enzime (glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz vb) taşınana kadar radikalle stabil bir yapı oluşturur.

Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir. Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı

metabolitler (süperoksit anyonları $O_2^{\bullet-}$, hidrojen peroksit H_2O_2, hidroksil radikali $^{\bullet}OH$), hipoklorik asit, kloraminmler, azot dioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir. Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur (Halliwell and Guitteridge 2005).

Serbest radikal oluşumuna sigara, herbisit ve pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışınları, X-ışınları, hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler neden olur. Aşırı egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber serbest radikal oluşumuna neden olur.

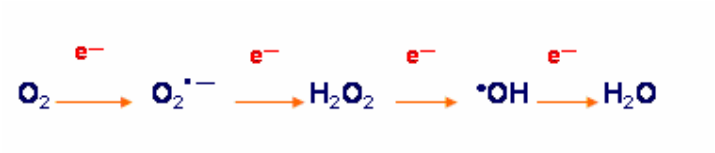
Bu etkiler oksidatif stres olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur. Serbest radikaller bu hasarları çeşitli mekanizmalarla yapmaktadırlar; lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfit bağı oluşumu ve DNA hasarı en temel etki mekanizmalarıdır (Kasai 1997).

2.1.1 Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türevleri

$O_2^{\bullet-}$ (süperoksit) radikali, H_2O_2 (hidrojen peroksit), $^{\bullet}OH$ (hidroksil) radikali, HOCl (hipokloröz asit), $\downarrow\uparrow$singlet O_2 ($^1O_2$), $R^{\bullet}$ (alkil radikali), $ROO^{\bullet}$ (peroksil radikali), $RCOO^{\bullet}$ (organik peroksit radikali), $HO_2^{\bullet}$ (perhidroksil radikali), $RO^{\bullet}$ (alkoksil radikali).

$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $^{\bullet}OH$ ve singlet oksijen ($^1O_2$) önemli reaktif oksijen türevleridir. Genellikle hücrelerde kullanılan oksijenin % 95'i mitokondrilerde kademeli olarak dört elektron eklenmesiyle suya indirgenir. Normal şartlarda bu mitokondriyal olay esnasında oksijenin % 1-2'si de süperoksit radikaline dönüştürülür. Süperoksit anyonuna ikinci bir elektron eklenirse aslında bir radikal olmayan H_2O_2'e indirgenir. H_2O_2'e üçüncü bir elektron eklenirse hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) oluşur.

Oksijenin reaktif türevleri indirgenme ve uyarılma ile oluşur.



Oksijen dört elektron alarak tümüyle indirgendiğinde su oluşur. Eğer ardı ardına bir elektron indirgenmesine uğrarsa biyolojik sistemlere zarar veren reaktif türevler oluşur (Halliwell and Guitteridge 2005).

Eğer moleküler oksijenin çiftlenmemiş elektronları enerji absorbsiyonu yoluyla daha yüksek bir enerji orbitaline aktarılırsa ve bunun spini değişirse singlet oksijen ($^1O_2$) oluşur. Bu olay uyarılmadır.

2.1.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Zayıf bir oksidant, güçlü bir indirgendir. Süperoksit radikalleri hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler. Süperoksit radikalleri iki mekanizmayla çalışır. Bu fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasıdır. Aynı zamanda yangı reaksiyonlarında normal dokulara bile zarar verebilecek aracılardır.

2.1.1.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit kuvvetli bir oksitleyici ajandır. Yavaş olarak reaksiyon verme eğilimindedir. Hidrojen peroksit, süperoksit dismutasyonu sırasında ya da oksijenin doğrudan indirgenmesiyle oluşur. H_2O_2 güçlü hidroksil radikallerini oluşturan Haber-

Weiss reaksiyonunda substrat olarak yer alır. Hidrojen peroksit bir radikal değildir ancak aktivitesi ve etkisi bakımından radikallere benzer.

2.1.1.3 Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)

Biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. Hidroksil radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır. Hidroksil radikalleri birkaç yolla oluşur. Su, hidrolizle ya da parçalanmayla hidrojen radikalleri ve hidroksil radikalleri oluşturabilir (Fenton reaksiyonu) veya demir gibi metal iyonlar varlığında süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin reaksiyona girmesiyle de oluşturulur (Haber-Weiss reaksiyonu) (Fung *et al*. 1997). DNA'nın pürin ve pirimidin bazlarıyla etkileşime girer (Saito *et al.* 2000).

DNA ile hidroksil radikallerinin etkileşimi durumunda radikallerin %80'i bazlara eklenir ve %20'den az kısmı da şeker grubundan bir hidrojen atomu alır.

2.1.2 Hücrede reaktif oksijen türevlerinin kaynağı

Hücrede reaktif oksijen türevlerinin (ROS) kaynağı iç ve dış etkenli olarak iki kısımda incelenir.

2.1.2.1 İç kaynaklar

Başlıca iç etkenli ROS kaynakları solunum, ksenobiyotikler metabolizması, fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentez ve biyodegradasyon ve en önemlisi Fenton – Haber Weiss reaksiyonu neticesinde oluşan $^{\bullet}OH$ radikalidir.

2.1.2.1.1 Fenton-Haber Weiss reaksiyonu

DNA hasarını açıklayıcı çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Hidroksil radikalleri hasar yapar. Süperoksit ve hidrojen peroksit ise doğrudan DNA' da hasar yapmaz.

Süperoksit radikali, hücreiçi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Ferritin +3 değerlikli demir içerir ve süperoksit bunu +2 değerlikli demire dönüştürerek serbest hale gelmesini sağlar. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss reaksiyonu gibi demir bağımlı olan radikal üreten reaksiyonlarda kullanılabilir. $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2, Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında, güçlü bir reaktif olan $^{\bullet}OH$ üretimine katkıda bulunur.

1 ve 2 numaralı reaksiyonlar demir/bakır katalizli Haber-Weiss reaksiyonları, 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar ise Fenton reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{3+} \quad .....(1)$$

$$H_2O_2 + Cu^{1+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Cu^{2+} \quad .....(2)$$

$$H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow HO_2 + H^+ + Fe^{2+} \quad .....(3)$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{3+} \quad .....(4)$$

Nükleusta $^{\bullet}OH$ radikali **Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları** ile oluşur. $^{\bullet}OH$ radikalinin DNA üzerinde etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Bilindiği gibi, $^{\bullet}OH$ çok reaktif olduğundan hücre içinde oluştuğu yerden diffüze olarak nükleusa geçmesi olası değildir. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H_2O_2'nin nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyon durumundadır. $Fe^{+2/+3}$ ve $Cu^{+1/+2}$ iyonları ya negatif yüklü DNA ya sürekli bağlı bulunurlar ya da oksidatif stres

altında intraselüler demirli ve bakırlı proteinlerden ayrılarak DNA'ya bağlanırlar. Bu bağlanma ile DNA'yı H_2O_2 in hedefi haline getirirler. Hidrojen peroksit bir radikal değildir. Ancak aktivitesi ve etkileri bakımından radikallere benzer, hidroksil radikali üretiminden büyük ölçüde sorumludur (Sharpe *et al*. 2003).

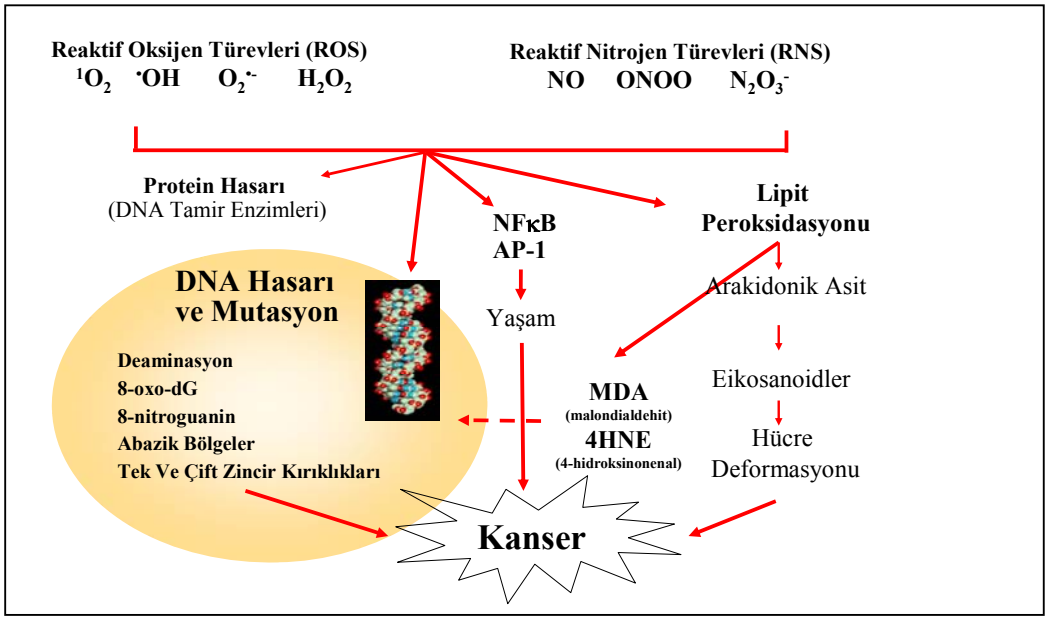
2.1.2.2 Dış kaynaklar

Başlıca dış etkenli ROS kaynakları ise çevresel kirlilik, sigara, pestisitler ve iyonize ışınlardır.

$$H_2O \xrightarrow{\text{İyonize radyasyon}} {}^{\bullet}OH,\ e_{aq}^{-},\ H^{\bullet},\ O_2^{\bullet -},\ H_2O_2,\ H_2$$

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak ROS'lar (reaktif oksijen türleveri) oluşur. Biyolojik sistemde reaktif oksijen veya oksijen radikallerinin hali-hazır (steady-state) düzeyi oksidatif stres olarak tanımlanır (Shigenaga *et al.* 1989).

ROS, oksijen radikallerini ve oksidan olan fakat radikal yapıda olmayan ve/veya radikallere kolaylıkla dönüşen maddelerin tümünü (HOCL, O_3, $ONOO^-$, $^1O_2$, H_2O_2) kapsayan bir terimdir. Organizmada ROS'ların yanı sıra reaktif nitrojen türevleri (RNS) de oluşmaktadır. RNS nitrik oksit, nitrojen dioksit radikallerini ve HNO_2 ve N_2O_4 gibi radikal yapıda olmayan maddelerin tümünü kapsayan bir terimdir. $ONOO^-$ genellikle her iki terim kapsamına da girer (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Serbest radikallerin hücresel fonksiyonlara olan etkisi

H_2O_2, $NO^{\bullet}$ ve $O_2^{\bullet-}$sadece birkaç molekül ile hızla reaksiyona girerken, $^{\bullet}OH$ radikali hemen hemen her molekül ile hızla reaksiyona girer. $RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, HOCl, $NO_2^{\bullet}$, $ONOO^-$ ve O_3 orta derecede reaktif metabolitlerdir. HOCl reaktif bir klor metaboliti olarak kabul edilir. Oksidatif stresin varlığı ROS/RNS ölçümü ile kanıtlanabilir (Wiseman and Halliwell 1996).

ROS'ların yüksek hasar potansiyellerinden dolayı, hızla metabolize edilmeleri önemlidir. Radikal hasarının engellenmesi amacıyla antioksidan savunma mekanizmaları çalışır.

Süperoksit anyon radikallerine ($O_2^{\bullet-}$) karşı ilk savunma mekanizması, $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin H_2O_2 ve O_2'e dismutasyonudur. Bu reaksiyonu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimi redoks aktif metal olarak sitozolde Cu, mitokondride Mn içerir (CuZnSOD, MnSOD). Peroksizomlarda meydana gelen H_2O_2, yine bu organellerde bulunan yüksek katalaz aktivitesi ile metabolize edilir. H_2O_2 membrandan kolayca difüze olduğundan,

peroksizomal katalaz hücrenin diğer kompartmanlarında oluşan H_2O_2'nin detoksifikasyonunda da rol alır. Sitozol ve mitokondride oluşan H_2O_2'nin metabolize edilmesi için en önemli enzim, selenyum içeren glutatyon peroksidazdır (GSHPx). Bu enzim indirgeyici ekivalan olarak GSH'u kullanarak H_2O_2'i suya indirger.

2.2 Oksidatif hasar

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllerde hasara neden olur. ROS, RNS ve özellikle $^{\bullet}OH$ radikali lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi tüm hücresel moleküllerle reaksiyona girerler (Halliwell and Guitteridge 2005). Bu reaksiyonla ikinci bir radikal oluşur ve bu radikal diğer moleküller ile reaksiyona girerek radikal zincir reaksiyonunu devam ettirir. Spontan olan bu reaksiyonlarda termodinamik kuralların gereği olarak yeni oluşan radikal bir öncekinden daha istikrarlıdır. Sabit son ürünlerin oluşması ile zincir reaksiyonları sonlanır.

2.2.1 Lipitlerde oksidatif hasar

ROS'a duyarlı hedef moleküller arasında çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) önemlidir. İki ya da çok sayıda çift bağ içeren bu moleküllerde bis-allillik metilen pozisyonlarına komşu çift bağın varlığı, karbon alillik hidrojen bağını zayıflatır.

İki ya da daha fazla çift bağ içeren herhangi bir yağ asidi, bu peroksidasyon reaksiyonlarına girerse de, lipit peroksidasyonuna duyarlılık bis-allilik metilen pozisyonlarının sayısı ile üstel olarak artar. *In vivo* lipit peroksidasyon ile membran yapısında yüksek oranda bulunan, özellikle dört veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinde azalma olur.

Lipit peroksidasyonunun ilerlemesi ile başta membran akışkanlığı olmak üzere, taşıyıcı ve reseptör fonksiyonlu membran proteinlerinin aktiviteleri azalır. Membran potansiyeli değişime uğrar ve sonuçta membranların yapısal bütünlükleri bozulur. Proton ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artması ile total iyon homeostazi kaybolur, hücre ve organelleri parçalanır.

Lipit peroksidasyonu özellikle ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynar. Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan MDA (Malondialdehit) gibi sitotoksik aldehitler protein ve DNA'lara bağlanarak hasara neden olurlar.

Oksidasyona uğrayan lipitler de, $^{\bullet}OH$ radikallerine ve iyonizan/UV radyasyona benzer şekilde serbest radikal oluşturarak hücresel makromoleküllerde hasara neden olabilirler. Lipit oksidasyonunun lipit hidroperoksit ara ürünleri ve karbonil bileşikleri, hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlüdür. Bu nedenle okside olmuş lipitler başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını amplifiye etme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Lipit alkoksil ($LO^{\bullet}$) ve peroksil ($LOO^{\bullet}$) radikalleri, $^{\bullet}OH$ radikalinden daha düşük reaktiviteye sahip olduğundan lipit radikallerinin reaksiyonları daha özgündür. Lipitler, membranın integral ya da periferal proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede olduğundan, lipit radikalleri hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine $^{\bullet}OH$ radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilirler (Halliwell and Gutteridge 1984).

2.2.2 Proteinlerde oksidatif hasar

ROS ve RNS'nin proteinler üzerindeki etkileriyle gelişen kimyasal reaksiyonlar karmaşıktır. Proteinlerde özellikle histidin, tirozin, fenil alanin gibi amino asitler oksidasyona yatkındır.

ROS çeşitli mekanizmalarla protein yapısını modifiye eder. Metal katalizli protein oksidasyonuna neden olarak (özellikle lizin, arginin, histidin ve prolin) karbonil gruplarının oluşumuna, fragmantasyon veya çapraz bağlanmaya neden olur, aldehit yapılı lipit peroksidasyon ürünleri sistein amino asidinin –SH grupları ile veya lizin, histidin ile kovalent olarak bağlanır. –SH gruplarının kaybı, okside glutatyonun aşırı oluşumu sonucunda, doğrudan doğruya oksidasyon ile veya bir metabolit ile arilasyon şeklide meydana gelebilir, oksidatif hasarlı olan reseptör, enzim ve transport proteinlerinin fonksiyonlarında bozulma olabilir, immün sistemi uyaran yeni antijenik yapılar oluşabilir. Diğer biyomoleküller de sekonder hasara katkıda bulunabilir. Örneğin DNA onarım enzimlerinin inaktivasyonu DNA replikasyonunda hataya yol açar (Halliwell and Guitteridge 2005).

Radikallerin protein molekülüne rastgele saldırı yapmaları sonucunda meydana gelen hasar, saldırı çok aşırı boyutlarda olmadıkça yıkıcı değildir. Eğer hücre, proteinde hasar birikimine izin veriyorsa ya da ROS, hücrenin korunması açısından özel önem taşıyan proteinlerdeki spesifik merkezlere, örneğin Cu^{2+} iyonlarını bağlayan histidin aminoasidine saldırı yapıyor ise oksidatif hasar önemlidir.

2.3 DNA'da Oksidatif Hasar ve Klinik Önemi

DNA stabil bir molekül olmasına rağmen yaşam boyunca fizyolojik şartlarda spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilmektedir. Deaminasyon ile sitozinden urasil veya 5-metil sitozinden timin oluşabilir. İnsan vücudundaki her hücre DNA'sının günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığını öne süren araştırıcılar vardır (Halliwell 2002).

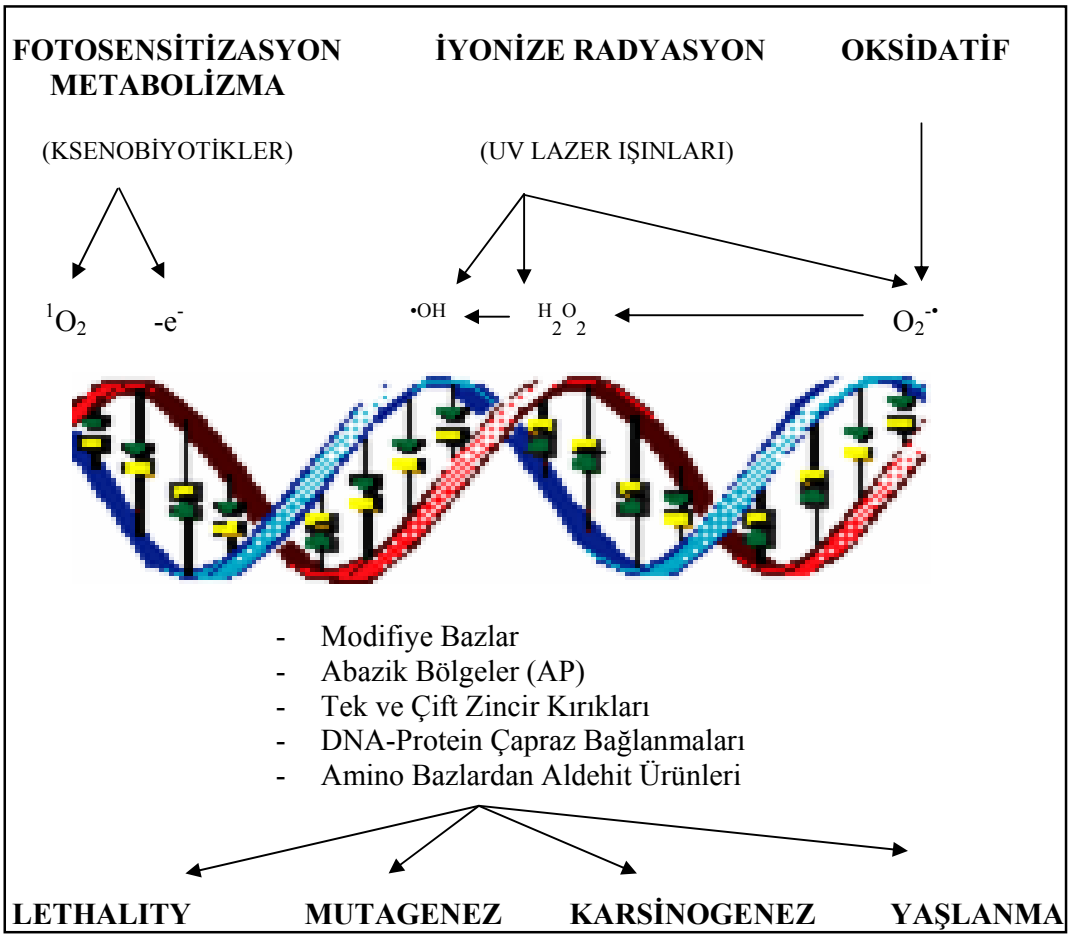
DNA'da oksidatif hasar yapan birçok etken belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda hasar yapan etkenler iyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dopamin, nöradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları,

tümör nekrozis faktör alfa olarak belirlenmiştir. Bu etkenler aşırı ROS/RNS oluşumuna neden olarak DNA'da doğrudan hasar yapabildiği gibi, onarım enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek de hasara neden olabilirler (Kasai 1997) (Şekil 2.2).

2.3.1 DNA hasarına neden olan etkenler

2.3.1.1 Eksojen (çevresel) etkenler

Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları v.b. gibi kimyasal ajanlar ve UV radyasyon, iyonize radyasyon v.b. gibi fiziksel ajanlar olarak belirtilmektedir.

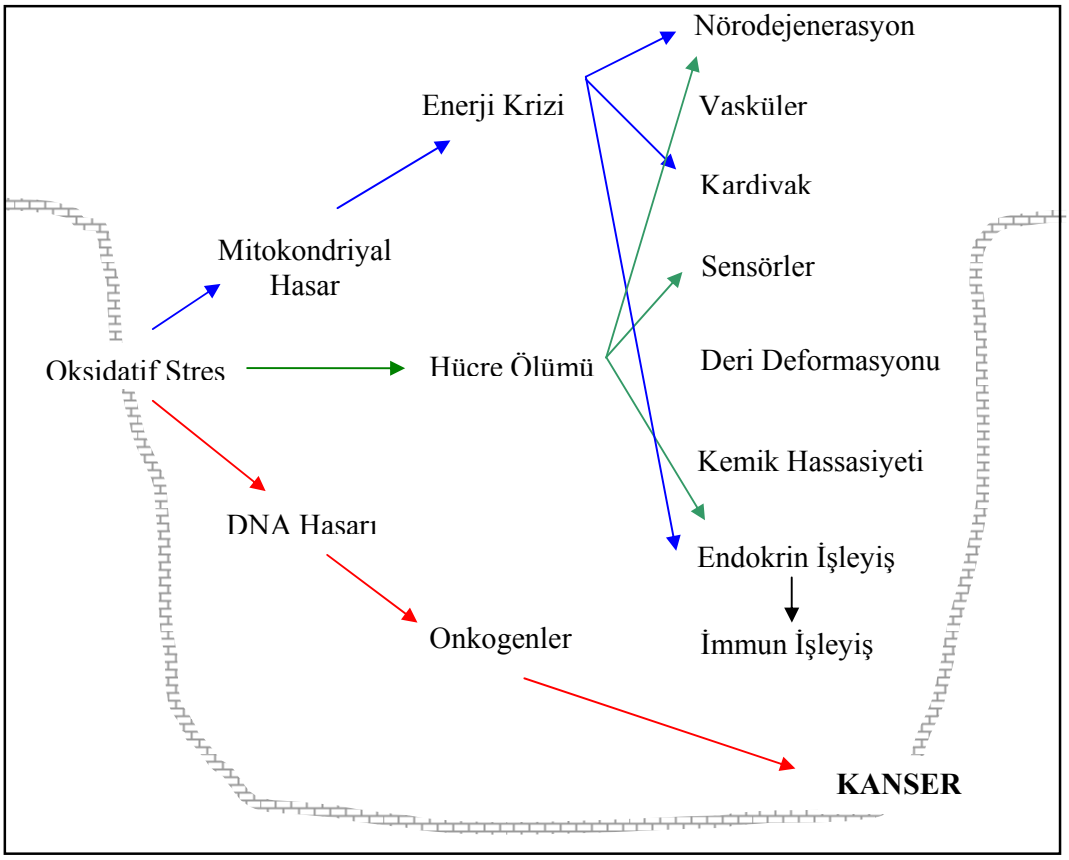


Şekil 2.2 DNA' da oksidatif hasar ve olası sonuçları

2.3.1.2 Endojen (spontan) etkenler

Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar; deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler; depürinasyon/depirimidinasyon (10.000/hücre/gün) gibi kimyasal değişiklikler; baz kayıpları ve oksidatif hasar (100.000/hücre/gün) olarak belirtilmektedir. Onarım yapılmazsa somatik mutasyon görülür.

Sürekli gelişmekte olan teknoloji, oluşan çevre kirliliği, sigara, UV vb. pek çok diğer etken sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır (Asayama and Kato 1990). Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla gösterir. Tüm bu nedenlerden dolayı dış etkilerle oluşan hastalıklar artmakta, genetik hastalıkların da çevresel etkilerle daha çok belirginleşmesine neden olmaktadır (Lopez-Torres *et al.* 2000). Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle bu hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir. Bunun için de ilaçlardan öte alınan besinler önem kazanmaktadır. Serbest radikallerin etkilerini önleyen ve dietimizde sıkça bulunması gereken vitaminler kanser ve kalp hastalıkları gibi toplumda erken ölümlerin başlıca nedenleri olan hastalıkların oluşumunu önlemektedir (Bianchi *et al.* 1999). Besinlerin dışında dışarıdan yapılacak takviyelerin de yararlı olduğu yapılan doz tesbit çalışmalarıyla anlaşılmıştır. Ancak vücudun hassas dengesi alınacak aşırı dozlarla bozulabilmekte, bunun sınırının konabilmesi gerekmektedir (Şekil 2.3).

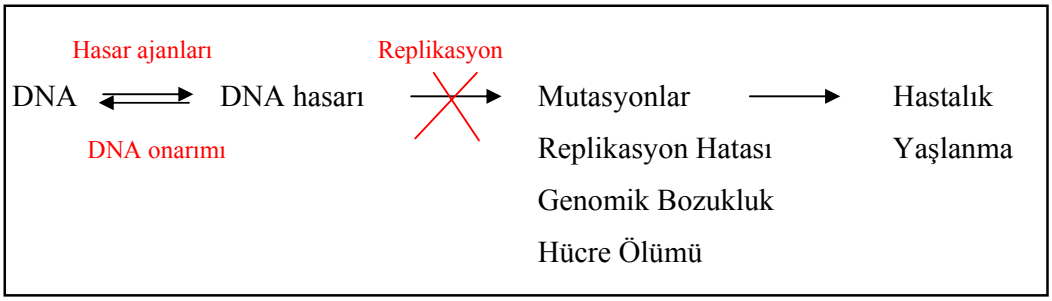


Şekil 2.3 Oksidatif stresin hastalıklarla ilişkisi

DNA'da oksidatif hasarın bir göstergesi kabul edilen 8-OHdG hem sıçan karaciğer mitokondri DNA'sında hem de nükleer DNA'da analizlenmiştir. Mitokondriyal DNA'da hasarın daha fazla saptanması mitokondride ROS'un daha fazla oluştuğu ve hasarın yeterince onarılmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Lopez-Torres *et al.* 2000).

ROS ve RNS, DNA'da oksidatif hasar yaparak DNA'nın yapısal değişimine yol açar. İlk oluşan lezyon zincir kırıklarıdır. Daha sonra baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme, delesyon, baz katılımı, dizi amplifikasyonu gibi yapısal değişiklikler meydana gelir. Oksidatif modifiye DNA antijenik karakter taşıyabilir ve anti DNA antikorlarının oluşumuna neden olabilir (Dizdaroglu 1991).

ROS ve RNS doğrudan DNA onarım enzimlerini ve DNA polimerazı okside eder. DNA onarım mekanizmasının etkinliği azalır ve replikasyonun doğruluğu korunamaz. DNA'da düşük düzeylerde oksidatif hasar, minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilir. ROS/RNS, DNA'da doğrudan hasar yaparak (tümör supresör gen olan p53'ün mutasyonu) kanser gelişimine katkıda bulunur. Buna ilaveten sinyal transdüksiyonunu aktive/inhibe ederek, hücre proliferasyonunun kontrolünde çok önemli olan hücreler arası etkileşime etki ederek, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozis/nekroz ile hücre ölümüne müdahale ederek, DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz gibi enzimlere hasar vererek, replikasyonun doğruluğunu azaltarak kanser oluşumuna yol açar (Wu *et al.* 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 DNA'da replikasyon doğruluğunun korunamaması ve olası sonuçları

Hücreler UV ışınına maruz kaldığında da DNA hasarı oluşabilir. İki şekilde DNA hasarı meydana gelebilir. UV ışın H_2O_2'e etki ederek $^{\bullet}OH$ radikali meydana getirebilir veya doğrudan pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilir. $^{\bullet}OH$ radikalleri yanında $H^{\bullet}$ ve e^{-}_{aq}'da DNA'ya etki eder. İyonize radyasyonun suyun hemolizine neden olarak, $^{\bullet}OH$ radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir (Dizdaroglu 1991).

DNA hasarının mutlaka kansere yol açması da beklenmemelidir. Düşük düzeylerde hasar, etkin bir şekilde onarıldığından ve yüksek düzeylerde oksidatif hasar ise hücre ölümü ile sonuçlandığından, orta düzeydeki hasarın maligniteye yol açma olasılığı çok yüksektir. Ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve reflü özafajit gibi kronik hastalıklarda $O_2^{\bullet -}$

ve H_2O_2'nin aktive fagositler tarafından fazla miktarda oluşturulması, inflamasyon ile kanser arasındaki yakın ilişkiyi açıklar. Bu gibi durumlarda antioksidan savunmanın güçlü olması, oksidatif strese karşı hücreyi korusa da kanserin meydana gelme olasılığını arttırır (Floyd 1990).

2.4 DNA'da Oksidatif Stres İle Oluşan Hasarlar

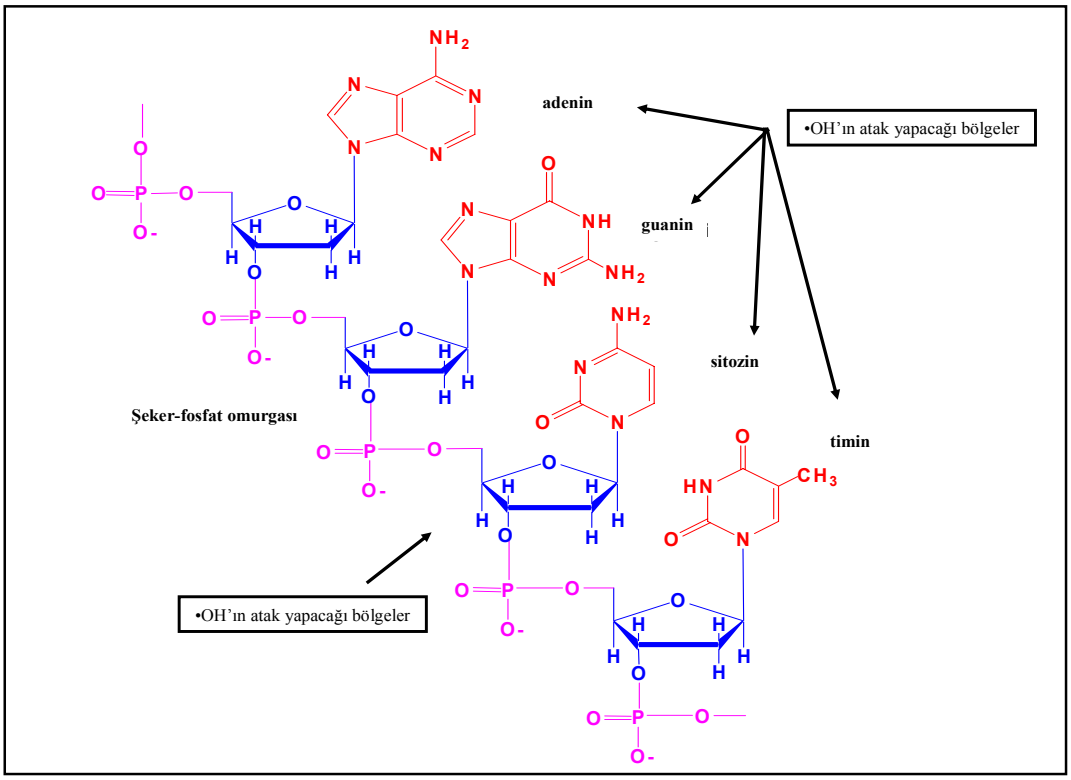
Oksidatif stres DNA üzerinde zincir kırıkları, abazik bölge oluşumu (AP), şeker hasarı, DNA-protein çapraz bağlanması, pürin ve pirimidin bazlarının modifikasyonu gibi çeşitli hasarlara neden olmaktadır (Halliwell and Dizdaroglu 1992).

Zincir kırıkları, DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermez. Tek zincir kırıklarında, diğer zincirdaki bilgi doğru okunarak hasarlı zincir onarıcı enzimlerle onarılabildiğinden çift zincir kırıklarındaki hasar daha önemlidir (Halliwell and Auroma 1991).

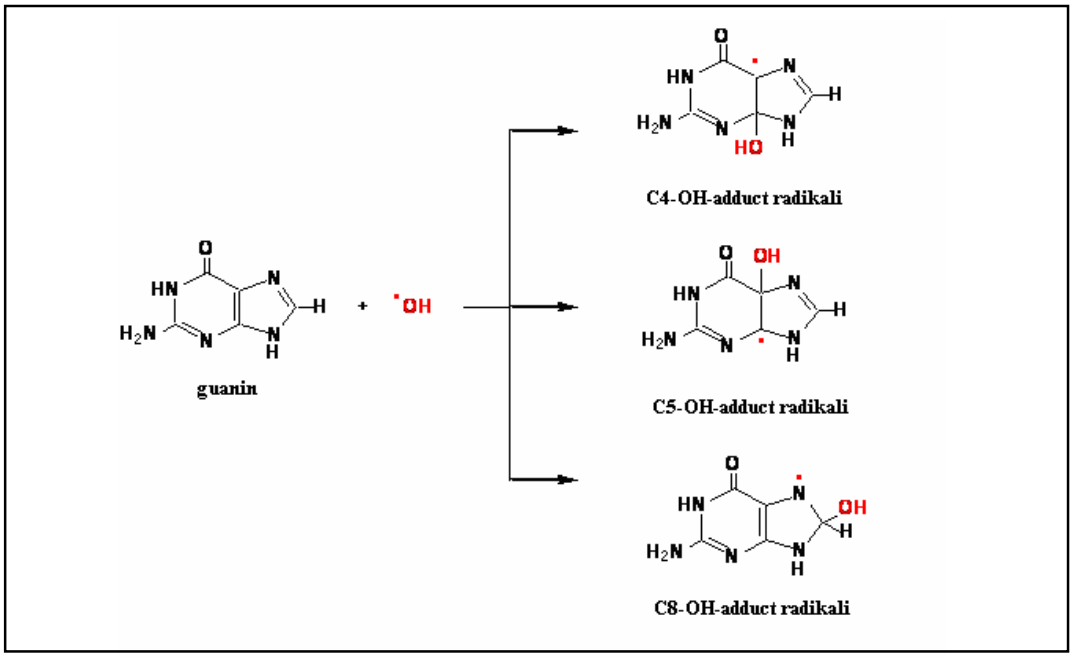
Deoksiriboz şekerlerin radikaller tarafından fragmantasyona uğratılması sonucunda birçok ürün oluşur. Şekerlerin tüm pozisyonlarına hidrojen atomlarının katılması ile karbon merkezli radikallerin oluşumu gözlenir. Bu radikaller O_2 varlığında hızla şeker peroksil radikallerine dönüşürler ve dehidratasyon, C-C bağlarının kopması, yeniden düzenlenme gibi bir seri reaksiyonla karbonil bileşiklerini oluştururlar. Deoksiriboz radyasyona maruz bırakıldığında karbonil ve dikarboniller oluşur. Deoksiriboz türevli radikallerin DNA'da abazik bölge oluşumuna zincir kırılmalarına yol açtığı saptanmıştır (Halliwell and Guitteridge 2005).

Birçok karbonhidrat gibi 2-deoksiriboz da Fe^{+2} bağlanma özelliğine sahip olduğundan Fenton reaksiyonu sırasında oluşan $^{\bullet}OH$ radikallerinin özellikle 2-deoksiriboz üzerine etkisi vardır. Buna karşın Cu^{+2} iyonları özellikle DNA'nın guanin-sitozince zengin bölgelerine bağlanır ve guaninin H_2O_2 ile reaksiyonlaşması sonucunda guanin baz hasarı oluşur (Halliwell and Auroma 1991).

Nükleer proteinlerin de radikallerin saldırısına uğradığı bilinmektedir. Böylece oluşan protein-türevli radikal, baz-türevli radikal ile çapraz bağlanarak DNA-protein çapraz bağlanması gerçekleşir (timin-tirozin). Bu oluşum kromatinin bozulmasına neden olur. DNA'nın onarımı, replikasyonu ve transkripsiyonu bozulur. ROS ve RNS doğrudan pürin, pirimidin bazlarına saldırdığında bazlarda modifikasyonlar meydana gelir. Hidroksil radikalinin atak yapacağı bölgeler şekil 2.5'te gösterilmiştir. Örneğin •OH radikali bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına katılarak çeşitli ürünler oluşturur (Şekil 2.6) (Simic 1994).

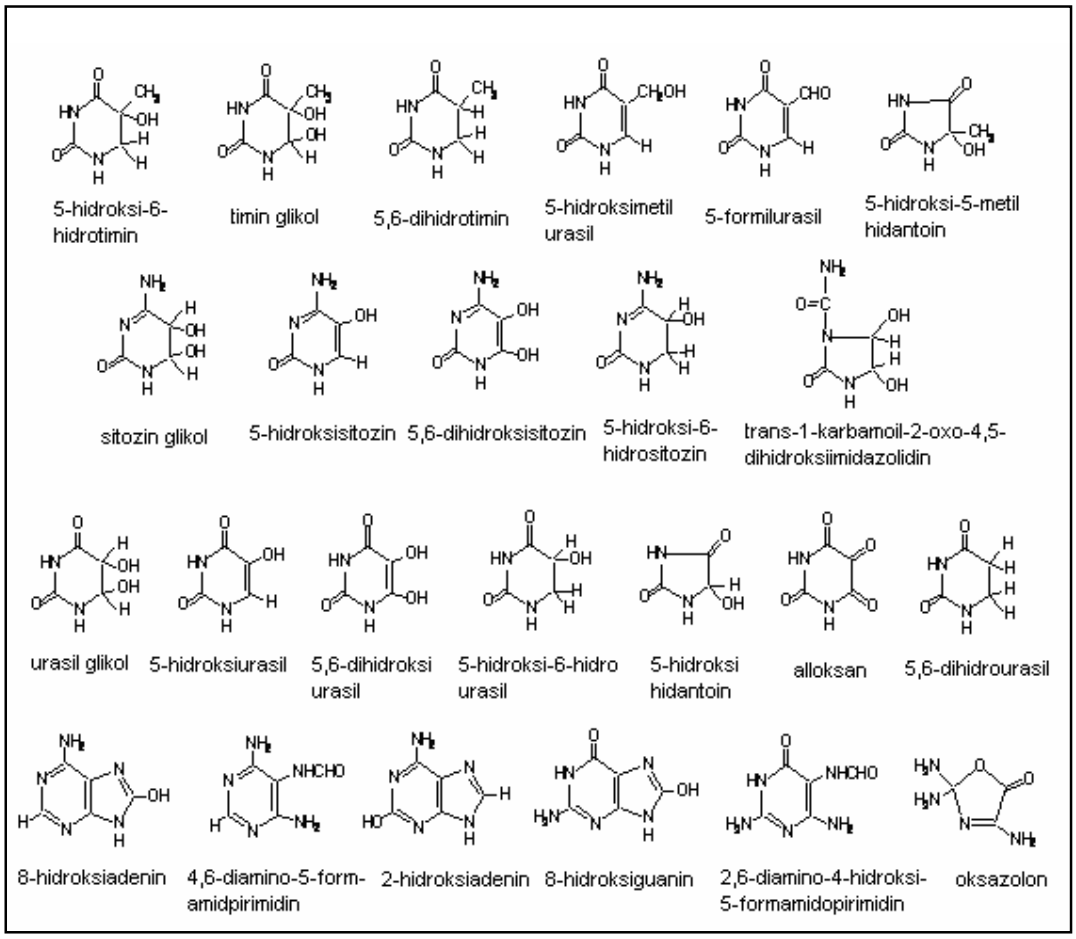


Şekil 2.5 Hidroksil radikalinin atak yapacağı bölgeler



Şekil 2.6 Hidroksil radikalinin guanin ile reaksiyonu

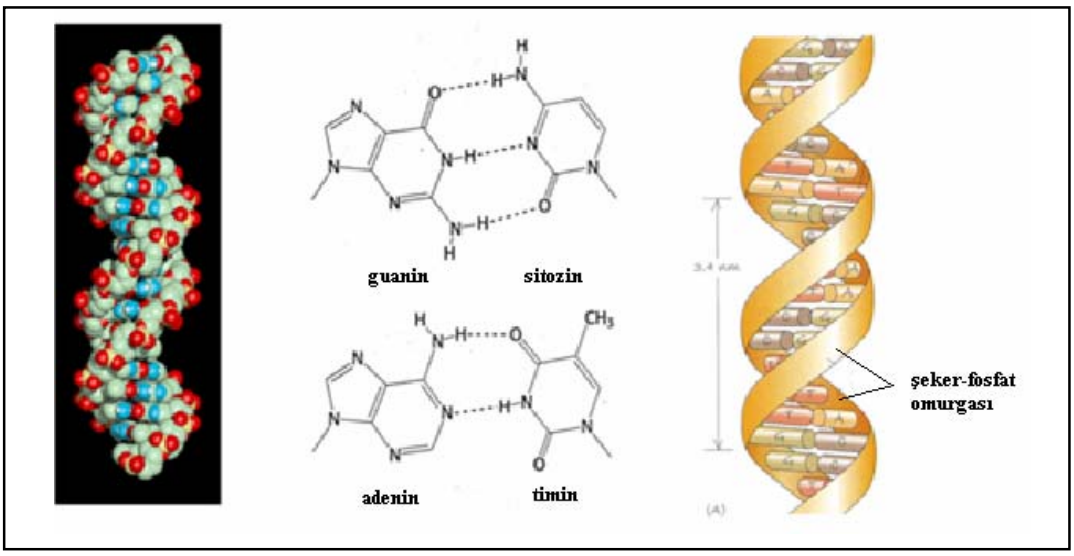
DNA'nın oksidasyonu ile oluşan baz modifikasyonları şekil 2.7'de görülmektedir. Bu baz modifikasyonlarından en fazla bilinen ve üzerinde en çok çalışılanı 8-OHdG'dir.



Şekil 2.7 DNA baz modifikasyonları (Dizdaroğlu 1991)

2.4.1 8-OH-Guanin oluşumu

Cu^{+2} iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığını ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığını gösterilmiştir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-OHdG'dir (Helbock *et al.* 1999). DNA'da normal baz eşleşmesi Guanin-Sitozin, Adenin-Timin'dir (Şekil 2.8).



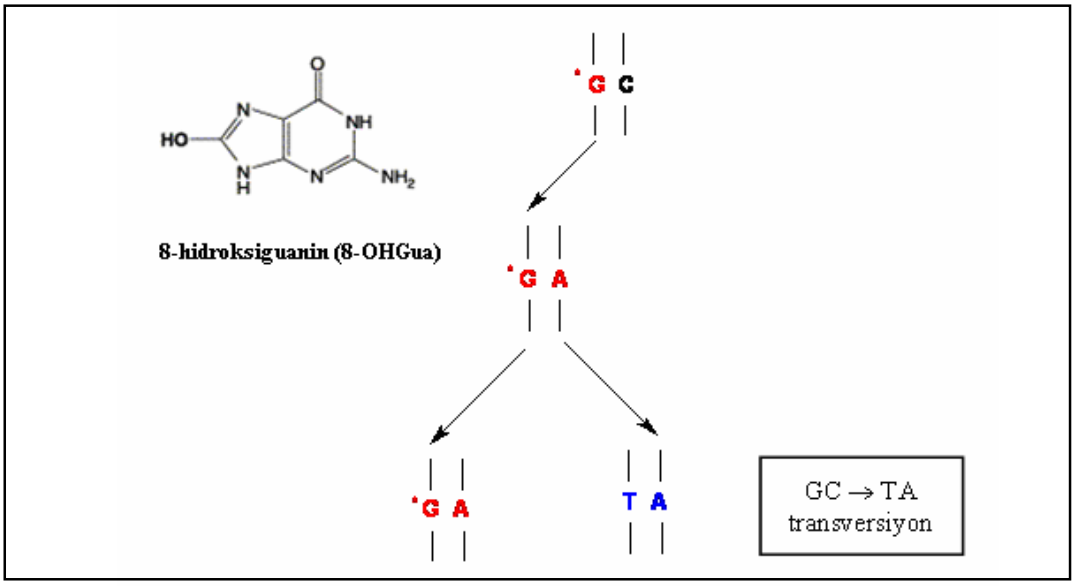
Şekil 2.8 Uygun bazların hidrojen bağıyla eşleşmesi

8-OHdG içeren DNA'nın, *in vitro* DNA sentezi sırasında bir kalıp olarak kullanıldığı zaman yanlış okumaya ve **GC—TA** mutajenezine yol açtığı gösterilmiştir (Kasai 1997).

$^{\bullet}$OH radikalinin C-8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-$^{\bullet}$OH) (Şekil 2.6), bir elektron ve proton kaybederek 8-OH-Gua (8-hidroksiguanin)'e okside olur veya bir elektron ve bir proton alarak indirgendikten sonra imidazol halkasının açılması ile 2,6-diamino–4-hidroksi–5-formamidoprimidin (FAPyGuanin)'e dönüşür. Düşük O_2 konsantrasyonlarında 8-OH-Guanin/FAPyGuanin oranı azalır (Kasai and Nishimura 1984a, 1984b).

Oksidatif DNA baz modifikasyonları, doğrudan ROS/RNS etkisi ile veya DNA replikasyonu ya da DNA hasarının onarımı sırasında oluşarak mutasyona yol açabilirler.

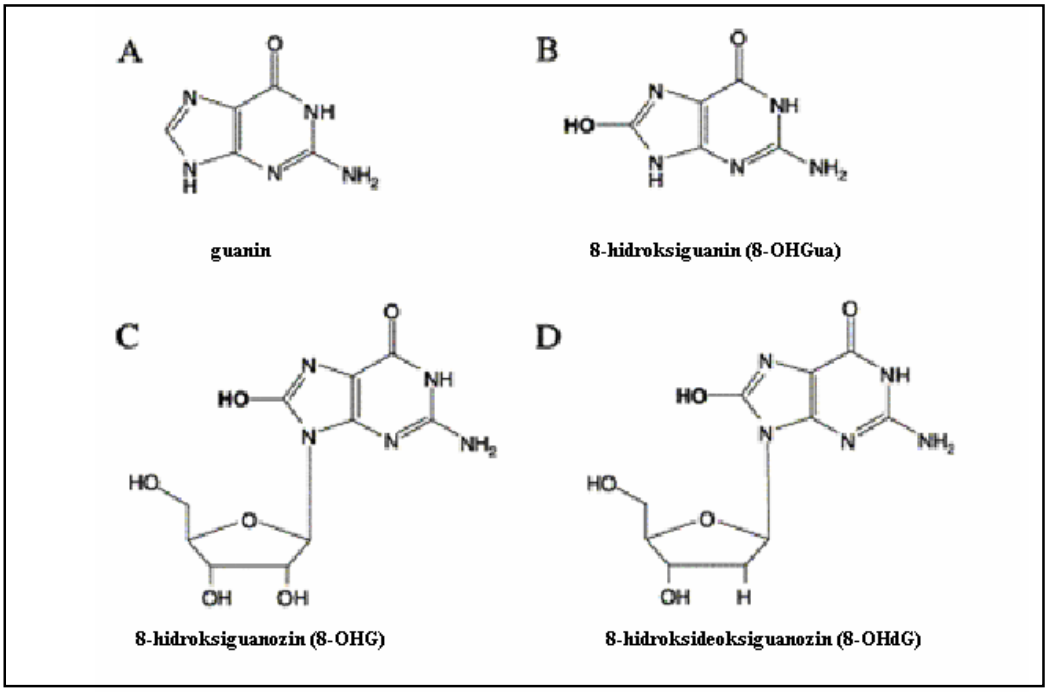
Timin glikol oluşumu DNA replikasyonunu kuvvetli bir şekilde bloke edebildiği gibi timin glikol önemli bir oranda yine doğru olarak adenin ile hidrojen bağı yaparak GC → TA (Cheng *et al.* 1991) transversiyon mutasyonuna neden olur (Şekil 2.9, Şekil 2.10).



Şekil 2.9 Hasarlı bazın yanlış eşleşmesi

8-OH-Ade (8-hidroksiadenin), büyük oranda timin ile eşleşirken düşük oranda guanin ile yanlış eşleşme yapabilir. Pürin halkasının açılması ile oluşan FAPyG, FAPyA lezyonları DNA replikasyonunu bloke ederek mutajenik etki gösterirler (Tchou *et al.* 1991).

Oksidatif hasarın neden olduğu mutasyonlar, genin konformasyonu ve baz dizilimi, onarım etkinliği, geni replike eden DNA polimerazın türü ve polimerazların doğru kopyalamasını etkileyebilecek olan çevre DNA'nın konformasyonu gibi birçok faktörlerden etkilenir.



Şekil 2.10 Guanin'den modifiye baz olan 8-OHdG'nin oluşumu

2.5 Antioksidan Savunma Sistemi

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denir. Radikal tarafından oluşturulan hasar durumunda devreye giren savunma sistemleri bulunmaktadır.

Antioksidanlar etkilerini: toplayıcı etki, bastırıcı etki, zincir kırıcı etki, onarıcı etki şeklinde gösterirler. Antioksidanlar genelde enzimatik antioksidanlar, antioksidan proteinler, düşük molekül ağırlıklı antioksidan maddeler ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak değerlendirilir (Halliwell and Guitteridge 2005).

Enzimatik antioksidanlara, SOD (Süperoksit dismutaz), Katalaz, Glutatyon peroksidaz, Glutatyon-S-transferazlar örnek verilebilir. Bakır, çinko, mangan, demir içeren süperoksit dizmutazlar vardır. CuZn-SOD, süperoksitin H_2O_2' e dönüşmesini sağlar.

Katalaz (H_2O_2 oksidoredüktaz), hücre içinde bulunur, hidrojen peroksiti yıkan enzimlerden biridir. Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümü reaksiyonunu katalizler. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px); Se GSH-Px aşırı H_2O_2 varlığında GSH'un GSSG'a oksidasyonunu katalizler. Bu arada hidrojen peroksit de suya dönüştürülür. Glutatyon-S-transferaz (GST), özellikle lipit peroksitlerine karşı antioksidan etkinlik gösterirler.

Antioksidan proteinlere, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, albumin, haptoglobin, ve hemopeksin antioksidanlar örnek verilebilir.

Düşük molekül ağırlıklı antioksidan maddelere, GSH, NAD(P)H**,** askorbat, ürat**,** bilirubin**,** mukus**,** α-Tokoferol ve β-Karoten örnek verilebilir.

Enzimatik olmayan antioksidanlara ise E (alfa tokoferol) ve C (askorbik asit) vitaminleri örnek verilebilir. Bunlar "eksojen antioksidanlar" olarak da bilinir.

2.6 Oksidatif Hasarın Onarımı

Aerobik organizmaların, mutasyonlardan korunabilmeleri ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için DNA onarım enzimlerinin doğru fonksiyon yapmaları mutlaka gereklidir. DNA'sı hasarlı olan hücreler, bölünmelerini genellikle onarım tamamlanıncaya kadar durdurarak kendilerini korurlar.

DNA polimeraz enzimlerinin hata düzeltici fonksiyonları da bulunduğundan, doğru kopyalama yapmalarına rağmen bazı hatalar oluşabilir ve "mismatch onarım" gerekebilir. Ayrıca spontan oluşan depürinasyon/deaminasyonların da onarımı gerekir. Tüm hücrelerde oluşan ROS ve bazı hücrelerde oluşan RNS, DNA'da mutajenik potansiyeli olan modifikasyonlara neden olurlar ve bunların da onarımı gerekir. DNA prekürsörleri de (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP) oksidatif hasara maruz kalabilir. Örneğin ROS'un etkisi ile 8OH-dGTP oluşabilir ve bu oluşum DNA polimerazların hatalı fonksiyonları sonucunda DNA'ya katılabilir. Ayrıca DNA'da karsinojen katılma

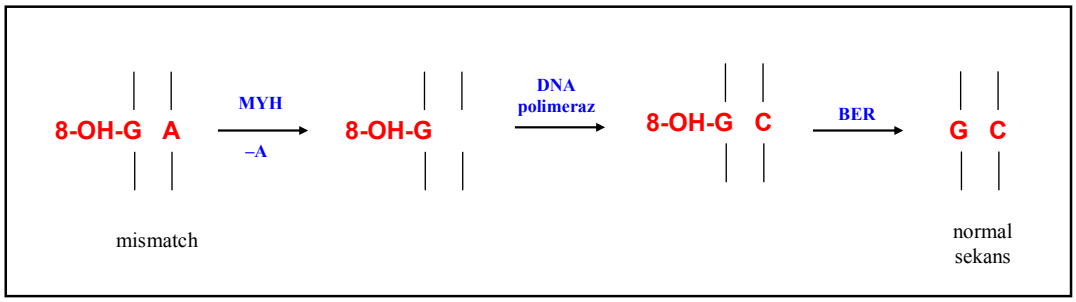
ürünleri varsa bunların da onarımı gerekir. DNA'nın çift sarmal yapıda olmasının bir avantajı, zincirlardan birinin hasarlı olması durumunda diğer sağlam zincirdaki bilginin doğru olarak kodlamada kullanılabilmesidir. Doğru bilgi kodlanamayacağından çift zincir hasarları daha önemlidir. Buna ilaveten çift sarmal yapıdaki DNA bazları hasar etkenlerine daha az maruz kalır ve daha az sayıda depürinasyon/deaminasyona uğrar (Voet *et al.* 2002).

DNA'da yanlış eşleşmiş, okside olmuş, deamine olmuş ve karsinojenler ile katılma ürünü oluşturmuş bazların onarımında 4 ayrı mekanizma vardır (Halliwell and Guitteridge 2005).

2.6.1 Mismatch onarım

Bu onarımda doğru bilgi taşıyan zincir kalıp olarak kullanıldığından onarım sistemi, kalıp ile yeni sentezlenen yanlış eşlenmiş zinciri birbirinden ayırt etmek durumundadır. Hücre bu ayrımı kalıp DNA'daki CH_3 gruplarını işaretlemek suretiyle yapar.

E.coli'de "mismatch" onarım sisteminde, zincirın belirlenmesi ve onarımında görevli en az 9 protein komponenti bulunur. Zincirın belirlenmesi, 5' GATC dizilimi içinde yer alan bütün A'leri N-6 pozisyonda metilleyen Dam metilaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Replikasyondan hemen sonra, çok kısa bir süre içinde "kalıp zincir" metillenmiş duruma geçer. Fakat henüz sentez edilen zincir metillenmemiştir. Yeni sentezlenmiş zincirda GATC diziliminin bu geçici metillenmemiş durumu zincirın belirlenmesine olanak sağlar. Replikasyon sırasında oluşmuş ve GATC dizilimine yakın yanlış eşleşmeler, kalıp zincirdaki bilgiye göre onarılır. Onarım GATC diziliminde guaninin 5' ucundan DNA'nın koparılması, çeşitli enzimlerle lezyonun hemen ötesindeki bir segmentin çıkarılması, oluşan boşluğun kalıp zincire göre doldurulması ve nick'in yapıştırılması basamaklarını içerir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Mismatch onarım mekanizması

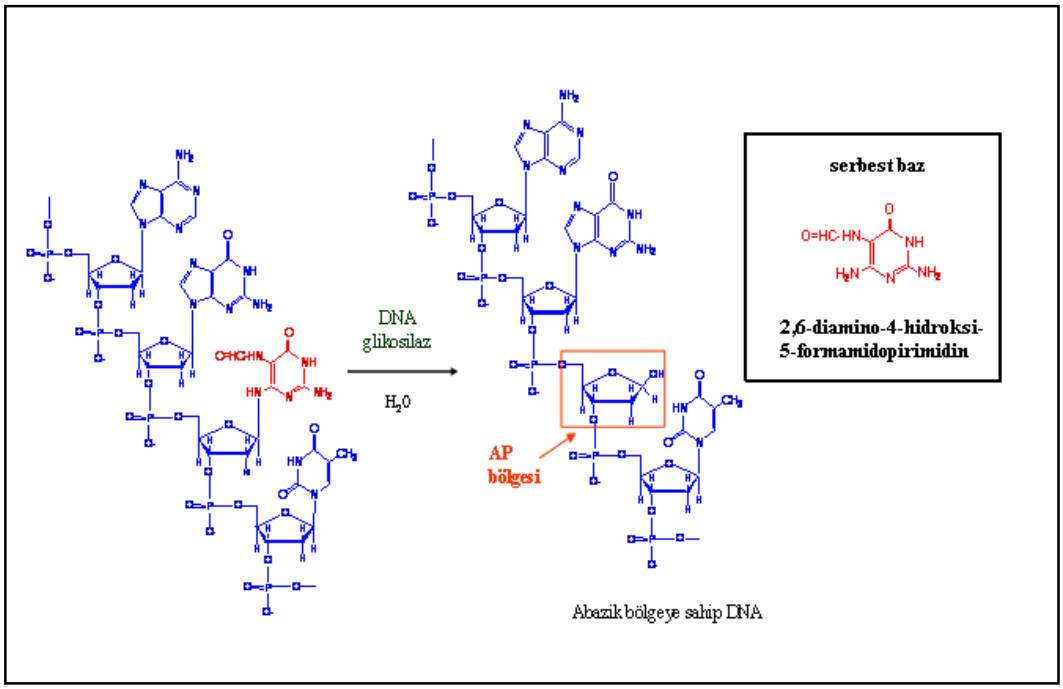
Her iki zincirdaki GATC dizilimi metillenmiş ise onarım azdır. Eğer zincirların her ikisi de metillenmemiş ise onarım olur ancak zincirların hiç birisi kalıp olarak kullanılamaz. Metilasyon ile yönlendirilen "mismatch" onarım sistemi metillenmiş GATC dizilimden 1000 baz uzaklıkta olan yanlış eşleşmeleri onarır. GATC dizilimin, kendilerinden oldukça uzakta olan yanlış eşleşmiş lezyonları hangi mekanizma ile yönlendirdikleri tam olarak anlaşılmamakla birlikte ilgili proteinler *E.coli*'den saflaştırılmış ve onarım *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir.

"Mismatch onarım" sisteminde tek bir DNA lezyonunun onarımı için, GATC dizisinden 1000 bazlık bir bölümün koparılması, aynı uzunlukta bir segmentin yerleştirilmesi ve çok sayıda dNTP gerektiğinden, onarım, enerji açısından çok pahalı bir işlemdir. Bu da hücre içi DNA onarımının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu sistem ile tüm yanlış eşleşmiş lezyonlar tanınıp onarılabildiği halde onarım tam yapılamaz. G-T lezyonları diğerlerine göre özellikle çok daha etkin bir şekilde onarıldığı halde C-C lezyonlarının onarımı daha az yapılır.

2.6.2 Baz çıkararak onarım

Bu tip onarım sistemi, hasarlı bazın doğrudan doğruya uzaklaştırılmasıdır. Spesifik DNA-glikosilaz enzimleri anormal baz ile şeker-fosfat arasındaki N-glikozid bağını hidroliz eder. Böylece DNA'da abazik bölgeler oluşur (Şekil 2.12). AP bölgeleri mutajeniktir, transkripsiyonu ve replikasyonu engeller. AP bölgeleri DNA'dan kendiliğinden baz kaybı ile de oluşur.

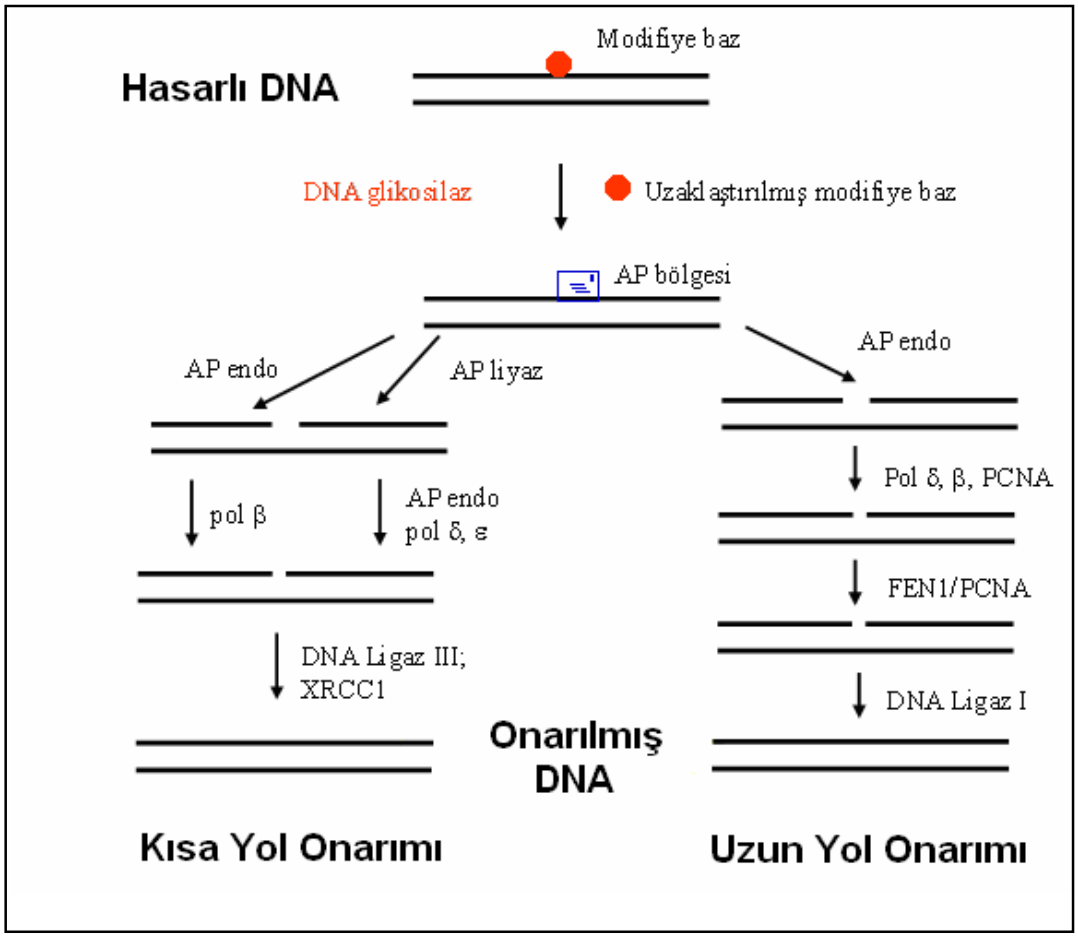
Hücrelerde, birçok özgün DNA glikosilaz enziminin görevi, sitozinden kendiliğinden deaminasyon ile oluşan urasili uzaklaştırmaktır. Bu enzimin özgünlüğü çok yüksek derecededir, yani RNA'dan urasil bazını uzaklaştırmaz, sadece DNA molekülüne özgüdür. Sitozinden deaminasyon ile urasilin meydana gelmesi ve urasil glikosilazın varlığı; DNA'nın urasil yerine neden timin içerdiğini açıklayan ve uzun süre nedeni anlaşılmayan bir gerçektir.



Şekil 2.12 DNA glikozilazın etkisi

Hem bakterilerde (*E.coli*'de FpG proteini) hem de memeli hücrelerinde bulunan Fapy glikosilaz enziminin görevi ise DNA'nın oksidatif baz hasar ürünlerinden olan 8-OHdG ve FapyG'i DNA'dan uzaklaştırmaktır.

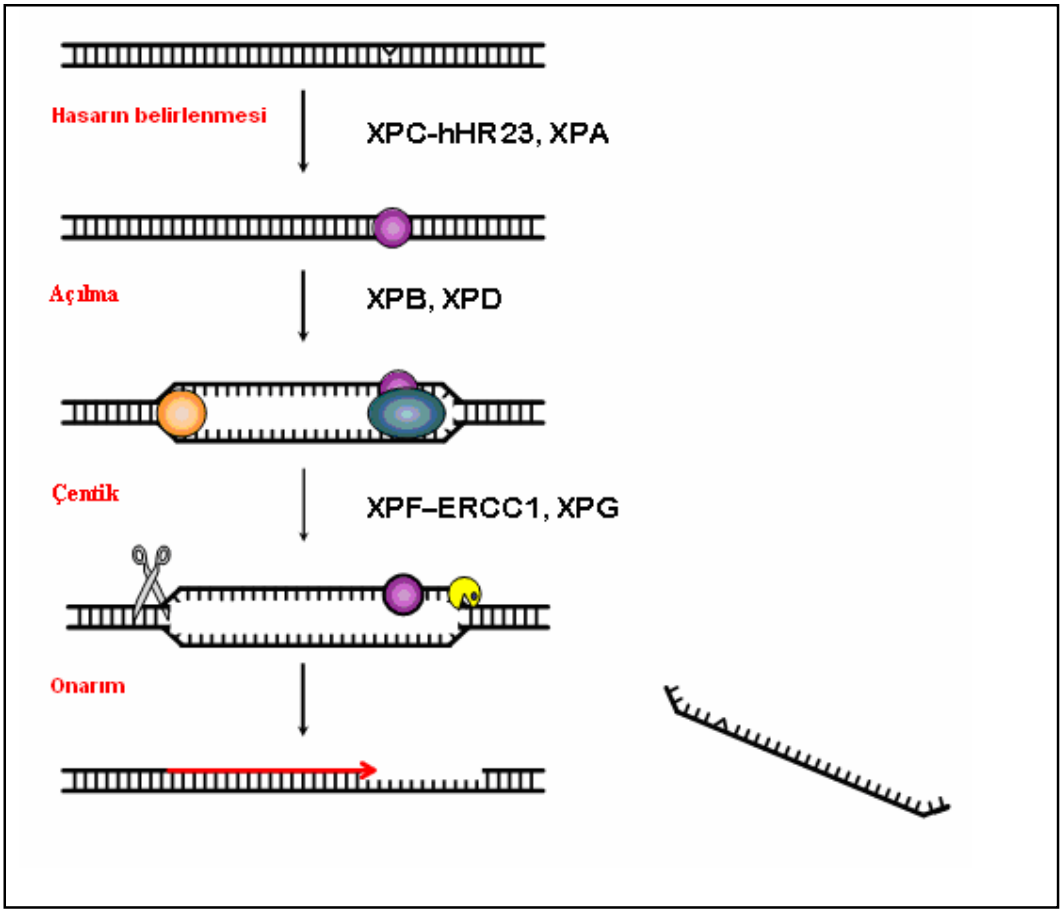
Hücrelerde bulunan tüm DNA glikosilazlar, yüksek derecede özgünlük göstererek hasarlı bazı tanır ve bazı koparark AP bölgeleri oluştururlar. Onarım, AP bölgelerine doğrudan doğruya bazın konması şeklinde gerçekleşmez, geride kalan deoksiriboz 5' fosfat AP endonükleaz ile uzaklaştırılır. Oluşan bir nükleotidlik boşluk ise DNA polimeraz ile doğru kodlanıp sentezlenir ve nick yapıştırılır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Baz çıkarma onarım mekanizması

2.6.3 Nükleotid çıkararak onarım

Ultraviole ışına maruz kalmış DNA'da oluşan pirimidin dimerleri ya da yanlış eşleşmiş DNA bazları, ATP bağımlı "excinuclease" komleksi tarafından kesilir. *E.coli*'de uvrA, uvrB, uvrC genlerinin kodladığı ABC "excinuclease" enzimi görev yapar. Bu enzim hasar görmüş DNA'yı, hasarın 5' ucundan 8 baz ve 3' ucundan 4 baz sonra olmak üzere 2 ayrı pozisyonda keser. İstenmeyen baz oligonükleotid yapısı içinde uzaklaştırılır ve bir boşluk oluşur. DNA polimeraz sağlam zincirdaki bilgiyi kullanarak DNA'yı sentezler. Yeni sentezlenen DNA parçası mevcut DNA zincirine DNA ligaz enzimiyle yapıştırılır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Nükleotit çıkararak onarım mekanizması (NER)

2.6.4 Doğrudan onarım

DNA'da istenmeyen değişiklikleri doğrudan uzaklaştırmaya ait bazı örnekler bilinmektedir. DNA fotoliyaz enziminin ışık ile oluşan siklobütan pirimidin dimerlerini, baz veya nükleotidi uzaklaştırmadan onarması örnek olarak gösterilebilir.

Işık ile indüklenen bir reaksiyonla oluşan pirimidin dimerlerini, baz veya nükleotidi uzaklaştırmadan onarması örnek olarak gösterilebilir. Işık ile indüklenen bir reaksiyonla oluşan pirimidin dimerleri, absorbe ettikleri ışığın enerjisini kullanan fotoliyaz enzimleri tarafından onarılmaktadır. *E. coli* fotoliyaz enzimi iki kromofor içermektedir. Bunlardan biri folat diğeri $FADH_2$'dir. Uyarılmış $FADH_2$ bir elektronunu pirimidin

dimer radikali oluşur. Bu yapı istikrarlı olmadığından monomerik pirimidine hızla dönüşür ve bu şekilde pirimidin dimerleri doğrudan onarılmış olur.

Bir diğer örnek ise DNA guaninin alkilleyici ajanlarla metilasyona uğraması ile oluşan, mutajenik bir lezyon olan O^6- metil guanin onarımıdır. Bütün türlerde bulunan bir enzim olan O^6- metil guanin DNA transferaz, aktif bölgesindeki sisteine O^6- metil grubunu transfer eder. Böylece kendisini inaktive ederken DNA'yı onarır. O^6- metil guanin DNA metil transferaz enzimi tek bir metil grubunun transfer işlemini yaptıktan sonra inaktive olan bir enzim proteini olduğundan intihar enzimi olarak tanımlanır.

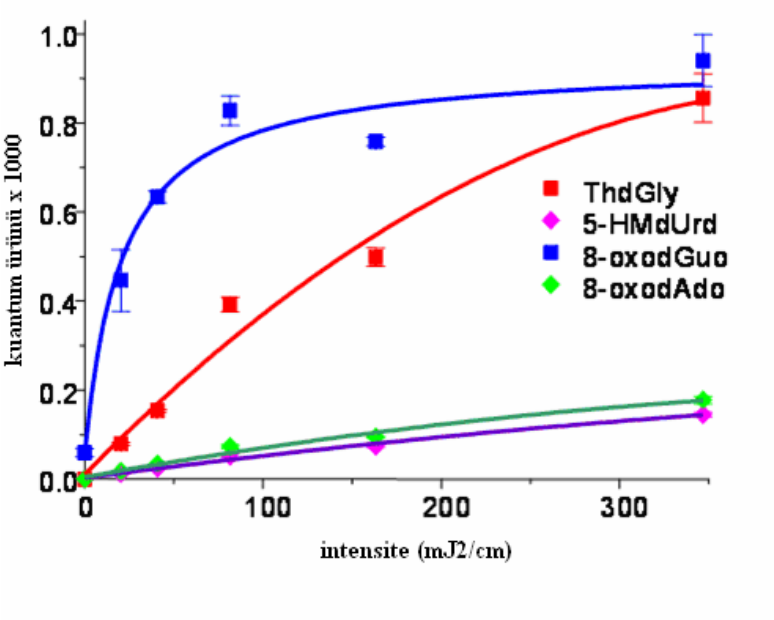
İnsanlar da dahil olmak üzere, bütün aerobik hücrelerden izole edilen DNA'da düşük düzeylerde hasarlı baz bulunması, onarım enzimlerinin modifiye bazların hepsini uzaklaştıramadığını düşündürmektedir. Gerçekten de Xeroderma Pigmentosum hastalığında nükleotid excision onarımında eksiklikler saptanmıştır. En sık rastlanan kalıtımsal kanserlerden olan non-polipozis kolon kanserinde mismatch onarımda eksiklik saptanmştır. Bloom's sendromunda eksikliğin nicklerin kapatılmasının çok yavaş ilerlemesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Nadir görülen bu hastalıklar DNA'da onarım mekanizmalarının mutlaka gerekli olduğunun kanıtıdır.

ROS/RNS'nin, DNA'da hasar oluşturabildiği gibi, onarım enzimlerini de inaktive edebileceği ileri sürülmektedir.

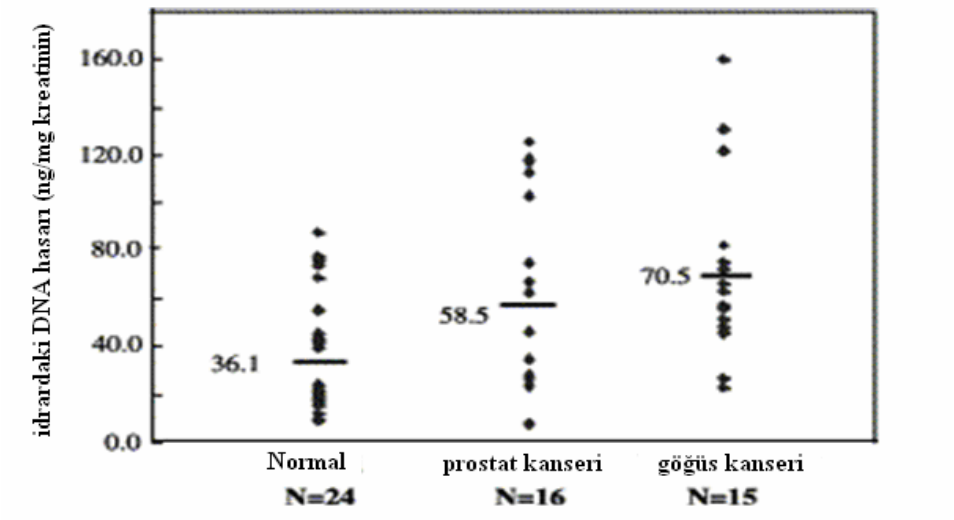
2.7 DNA Hasarının Klinik Önemi

Oksidatif stres; kardiyovasküler sistem patolojileri; aterosklerozis, iskemi-reperfüzyon injürisi, genetik ve metabolik bozukluklar; kronik granülomatöz hastalık, diabetes mellitus, Down sendromu, yaşlanma, otoimmun hastalıklar, kanser, mesane, bağırsak, göğüs, kolorektal, karaciğer, özofagus, akciğer, deri, prostat, lösemi, enfeksiyöz hastalıklar; *H. pylori*, hepatit, AIDS, pnömoni, malarya, influenza virüsü, allerjik patolojiler; bronşial astma, aspirin intoleransı, gıda intoleransı, ilaç allerjileri ve toksisiteleri, nörodejeneratif hastalıklar; alzheimer hastalığı, amyotrofik lateral

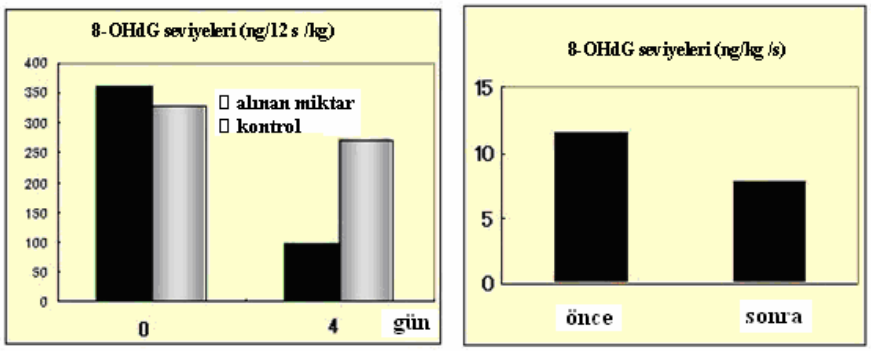
sklerozis, parkinson hastalığı, prion hastalığı, huntington hastalığı, allerjik ensefalomyelit, oftalmik patolojiler; katarakt, glokom gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Erhola *et al.* 1997, Cooke *et al.* 2002) (Şekil 2.15, Şekil 2.16, Şekil 2.17 ve Şekil 2.18).



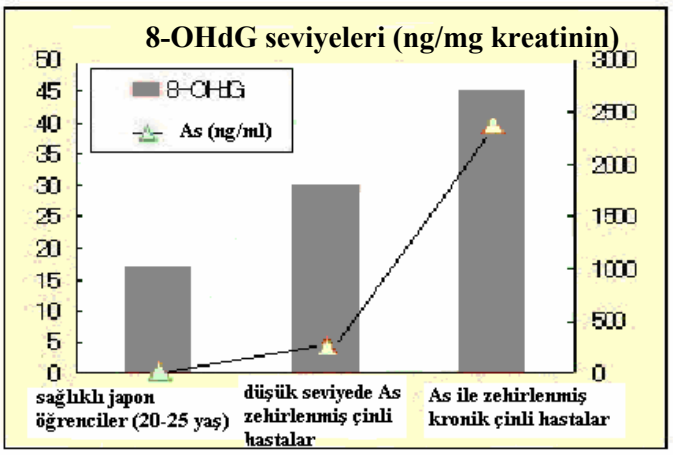
Şekil 2.15 Hasara en fazla maruz kalan baz 8-OHdG



Şekil 2.16 Prostat ve göğüs kanseri olan bireylerde DNA hasarının normal bireylere oranla fazlalığı



Şekil 2.17 Dört gün boyunca günde 3 kere meyve suyu (a) ve 30 gün boyunca günde 6 g yeşil çay (b) alımının hasar üzerine olumlu etkileri



Şekil 2.18 Arsenik zehirlenmesinin hasar üzerine olumsuz etkisi

İnsanlar dahil olmak üzere, bütün aerobik hücrelerden izole edilen DNA'da düşük düzeylerde hasarlı baz bulunması, onarım enzimlerinin modifiye bazların hepsini uzaklaştıramadığını düşündürmektedir.

Geçekten de Xeroderma Pigmentosum hastalığında NER' de eksiklik saptanmıştır. En sık rastlanan kalıtımsal kanserlerden olan kolon kanserinde mismatch onarımda eksiklik saptanmıştır. Bloom's sendromunda eksikliğin, çentiklerin kapatılmasının çok yavaş ilerlemesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Nadir görülen bu hastalıklar DNA'da onarım mekanizmalarının mutlaka gerekli olduğunun kanıtıdır (Halliwell 2002).

2.8 Tiroid Bezi

Tiroid bezi endokrin bezlerin en büyüklerinden olup, yaklaşık 20 gram ağırlığındadır. Tiroid bezi, boynun adem elması denen kıkırdağın hemen altında ve soluk borusu önünde bulunur, kelebek şeklindedir. Sağ ve sol olmak üzere iki tiroid lobundan oluşur. Bu iki lob isthmus denen ince bir doku bandı ile birbirine bağlanır. Tiroid bezi kan damarlarınca çok zengindir. Tiroid bezi birçok küremsi (sferik) folikül denilen oluşumlardan meydana gelmektedir. Foliküllerin çeperi tek sıralı epitel hücreleri ile çevrilmiştir. Folikülün ortasındaki boşluk yarı sıvı ve protein yapısında kolloid adı verilen bir madde ile doludur. Sentez edilen hormonlar kolloid içerisinde biriktirildiğinden bu madde tiroid hormonlarının deposunu oluşturur. Bez istirahat halinde iken folikülü çevreleyen epitel hücreleri yassı ve folikül boşluğu geniştir. Bez aktif iken foliküller küçülürler ve epitel hücreleri kübik (kolummar) bir biçim alırlar.

Tiroidin esas fonksiyonu vücudun ihtiyacına göre tiroid hormonlarını üretmektir. Tiroksin (T_4) ve triiyodotironin (T_3) olmak üzere iki çeşit tiroit hormonu mevcuttur. Tiroksin 4 ve triiyodotironin 3 iyot taşıyan amin asididirler. İyot, iyon halinde iyodid (indirgenmiş formda I^-), okside olmuş formda iyot (I_2), ya da organik bileşik halinde iyot olarak besinlerle alınır. Tiroid bezi hücreleri iyodidi aktif transport yoluyla dolaşım kanından hücre içine alırlar. Bez içinde kan plazmasında ya da serumda bulunandan çok daha fazla iyodid bulunur. Tiroid bezi hücreleri iyodid akümüle ederler.

Dolaşıma katılan T_4 ve T_3 burada serbest ve bazı proteinlere bağlı olarak bulunur (%99'u bağlı formdadır). Serbest hormon fraksiyonları total T_4 (TT_4) ve total T_3 (TT_3)'ün çok az bir kısmını oluşturur. Metabolik yönden aktif olan fraksiyon serbest tiroid hormonlarıdır (ST_4 ve ST_3). Başlıca üç adet tiroid hormonu bağlayan protein vardır; tiroksin bağlayan globulin (TBG), tiroksin bağlayan prealbümin (transtiretin) ve albümin. Hormon bağlayan proteinlerin en önemlisi tiroksin bağlayan globulin (TBG)'dir. T_3 ve T_4 için yüksek afinitesi sayesinde dolaşımdaki tiroid hormonlarının %70'inin taşınmasından sorumludur. Tiroglobulin (TBG) bir glikoproteindir ve tiroid hücreleri tarafından sentezlenerek kolloid içine salınır. Kolloid içinde tirozin amin asidinden iyodine ve kondanze edilmek suretiyle T_4 ve T_3 sentezlenir. Sentezlenen

hormonlar salınıncaya kadar tiroglobuline bağlı olarak bulunurlar. Salınacakları zaman kolloid pinositoz yoluyla bez hücrelerinin kolloide bakan uçlarındaki "reasorption lacunae" içine alınır; peptid bağı lizozom enzimleri tarafından hidrolize edilir ve serbest kalan hormonlar, tiroksin ve triiyodotironin, kan kılcal damarlarına verilirler. Her iki hormon bezde ve kan plazmasında bulunurlar. T_3'ün çoğu T_4'ün $5'$-deiyodinasyonu ile perifer dokularda meydana gelir. Biyolojik olarak T_3, T_4'ten daha aktiftir (Erdogan 2003).

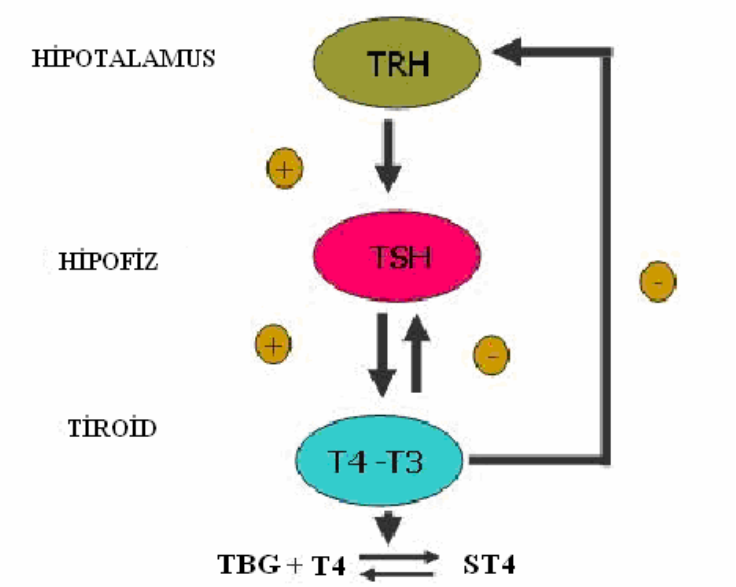
Tiroid hormonlarının etkileri çeşitlidir. Genomik etkileri arasında doku büyümesi, beynin olgunlaşması, kısmen Na^+, K^+ -ATP'az aktivitesindeki artışa bağlı ısı üretiminde ve oksijen tüketiminde artış ile beta adrenerjik reseptörlerde artış sayılabilir. Fizyolojik etki olarak; fetal gelişim üzerine etkileri, oksijen tüketimi, ısı üretimi ve serbest radikal oluşumu üzerine etkileri, kardiyovasküler etkiler, sempatik etkiler, gastrointestinal etkiler, iskelet sistemine etkileri, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasına etkileri, endokrin etkileri, vitamin metabolizmasına etkileri olarak sayılabilir.

Oksijen tüketimi, ısı üretimi ve serbest radikal oluşumuna etkisinde T_3'ün beyin zincirak ve testis hariç bütün dokularda kısmen Na^+ , K^+ -ATPaz'ı uyararak O_2 tüketimini ve ısı üretimini arttırdığı görülmektedir. Bu etkileri bazal metabolik hızdaki artışa katkıda bulunur. Tiroid hormonları süperoksit dismutaz seviyelerini azaltarak serbest radikal olan süperoksit anyon düzeylerini arttırır. Bu etki kronik hipertiroidizmin kötü etkilerine iştirak edebilir.

Tiroid fonksiyonunun en önemli regülatörü TSH (tiroid uyarıcı hormon)'dır. TSH ve tiroid hormonları arasında "negatif feedback" mekanizması mevcuttur. TSH, tiroid bezine iyodun taşınmasını, oksidasyonunu, organik bağlanmasını, iyodotirozinlerin birleşmesini ve tiroid hormonlarının kana verilmesini uyarır. Sadece periferik T_4-T_3 dönüşümüne TSH'ın etkisi yoktur.

T_4 ve T_3 hormonları vücudumuzun metabolizmasını düzenler, metabolizmanın hızını kontrol eder ve "negatif feedback mekanizması" ile çalışırlar. Bu mekanizmaya göre

beyinde hipotalamus denilen bölgede TRH (tirotropin salgılayıcı hormon) salgılanır. Bu hormon hipofiz bezine etki ederek TSH salgılanmasını sağlar. TSH ise tiroit bezine etki ederek T_4 ve çok az miktarda T_3 yapımını ve salgılanmasını sağlar. T_4 ve T_3'ün büyük bir kısmı kanda bulunan proteinlere bağlanır, çok az bir kısmı ise serbest olarak kanda dolaşır. Bu hormonlar belirli bir düzeye geldikten sonra hipotalamus ve hipofiz üzerine baskı yapar ve TRH ve TSH'nın salgılanmasını durdurur. Kullanım sonucu hormonlar azalınca baskı ortadan kalkar TRH ve TSH tekrar salgılanır ve aynı şekilde tiroid hormonları yeniden vücut ihtiyacına göre üretilir (Şekil 2.19) (Bianchi *et al*. 1999).



Şekil 2.19 Tiroid hormonunun salgı mekanizması

Tiroid bezinin büyümesi (guatr), tiroid bezinin içinde normal dışı doku oluşumu (nodül), tiroid bezi iltihabı (tiroidit), T_4 ve T_3 hormonlarının bezden aşırı salgılanması (hipertiroidi) ve tiroid hormonlarının (T_4 ve T_3) az salgılanması (hipotiroidi) tiroid bezine ait bazı hastalıklara örnektir.

2.8.1 Hipertiroidizm ve tirotoksikoz

Tirotoksikoz tiroid hormonlarının fazlalığına bağlı oluşan klinik ve metabolik tablodur. Hipertiroidi ise tiroid glandının fazla çalışması ve fazla hormon üretmesidir. Hipertiroidizimli tirotoksikoz nedenlerinden en sık görüleni Graves hastalığı (toksik difüz guatr)'dır.

2.8.1.1 Graves hastalığı ve sebebi

Ülkemizde en sık rastlanan hipertiroidi nedenlerinden biridir. Otoimmun bir hastalıktır. ST_3 ve ST_4 yüksektir. TSH düşüktür. Normal durumda hipofiz bezinden salınan TSH, tiroid bezi hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak adenilat siklazı aktive eder; cAMP miktarını arttırır. cAMP artışı tiroid hormonu sentezine ve kana verilmesine neden olur. Kanda tiroid hormonu düzeyi artınca TSH salınması inhibe edilir. Bu şekilde negatif feedback yoluyla tiroid fonksiyonu düzenlenir. Graves hastalığında TSH reseptörlerine karşı antikorlar oluşur. Bu antikorlara tiroid reseptör antikorları (TRAb) denir. Bunlar TSH reseptörleri ile birleştiği zaman TSH'dan daha fazla miktarda tiroid hormon yapımını artırır. Burada negatif feedback mekanizması çalışmaz; tiroid hormonu TSH salınmasını inhibe eder, fakat antikoru inhibe etmez. Genetik burada önemli rol oynar (Komosinska-Vassev *et al.* 2000).

Hastalıkta bazal metabolizma ve çoğu organ fonksiyonunda hızlanma vardır. Taşikardi, nabız basıncı artışı, terleme, kilo kaybı, proksimal kas güçsüzlüğü, kas atrofisi, canlı bakış, üst gözkapağı retraksiyonu, keratit, optik sinir tutulumu ve körlük gibi rahatsızlıklar görülebilir.

2.8.2 Hipotiroidizm

Tiroid hormonu üretiminin azalması ya da tiroid hormonuna periferal doku direnci sonucu gelişir. Hormon üretiminin azalması primer, sekonder ya da tersiyer nedenlerle olabilir. En sık nedeni primer hipotiroididir. Bunun en sık nedeni Hashimoto tiroiditi sonucu gelişen hipotiroididir.

Hipotiroidi tüm organ ve sistemleri etkiler. Organizmada bazal metabolizma ve birçok sistem fonksiyonları yavaşlar. Kolay yorulma, kilo artışı, kas krampları, su atılımının azalması, anemi, hipoksi, hipertansiyon gibi rahatsızlıklar görülebilir.

2.8.2.1 Hashimoto tiroiditi

Hipotiroidiye neden olan hastalıkların başında tiroid bezinin otoimmün kökenli hasara uğramasıyla oluşan Hashimoto tiroiditi yer almaktadır. Hashimoto tiroiditi; kronik tiroidit, lenfositik tiroidit, lenfadenoid guatr ve son zamanlarda otoimmün tiroidit olarak da bilinmektedir. İlk kez 1912 yılında Hakaru Hashimoto isimli bir Japon hekim tarafından tanımlandığı için bu ismi almıştır. Tanıda TSH yüksekliği en önemli bulgudur. T_4, T_3, ST_4 ve ST_3 değerlerinin düşük seviyelerde olması beklenir. Vücut kendi kimyasına karşı antikor üreterek kendi dokularını yok etmeye çalışır. Bu antikorlara otoantikor denir. Hashimoto tiroiditinde antikorlar, tiroid hücreleri içinde bulunan tiroitperoksidaz (TPO) ve tiroglobulin (tg)'e karşı oluşur ve bu maddelere karşı saldırarak onları yok etmeye çalışır. Bu sırada kanda bulunan bazı lenfosit hücreleri de tiroit bezi içine girer ve bir kısım tiroit folikül hücrelerinin fonksiyonunu engeller. Bu durumu telafi etmek için tiroid hücreleri çoğalır. Bu olaylar tiroidin şişmesine ve bazı folliküllerin parçalanmasına neden olur. Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı gibi genetik bir hastalıktır.

Reaktif oksijenler, endokrin bezlerinin otoimmün hastalıklarının gelişiminde rol oynamaktadır. Tiroid hormonları, bazal metabolizmayı hızlandırır. Hormon miktarındaki artış, oksijen tüketimi ve ısı üretimini arttırır (Alıcıgüzel vd. 2001). Bu etkiler de bazal metabolik hızdaki artışa katkıda bulunur. Böylece serbest radikal olan süperoksit anyon düzeyleri arttırılır. Bu durum sıçan kalp mitokondrisinde yapılan çalışmada gösterilmiştir (Lopez-Torres *et al.* 2000). Hipertiroidli hastalarda oksijen tüketim oranının arttığı gözlemlenmiştir. Bu metabolik durum, serbest radikal üretimindeki artış ile oksijen toksisitesi ile sonuçlanır. Hipertiroidli hastalarda serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonunun artması, bu hastalarda serbest radikallerin bu dokularda zarara neden olduğunu göstermektedir (Asayama and Kato 1990).

2.9 Oksidatif DNA Hasarı Ölçüm Yöntemleri

İnsanlarda kanserli dokularda ve genellikle oksidatif stres koşullarında, oksidatif hasarda saptanan artış, hasarın artması ve onarımın azalması nedeni ile olabilir.

Oksidatif DNA hasarlarından biri olan zincir kırıklarının analizlenmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları [^{3}H] timidin tutulumu, BrdU tutulumu, enzimatik işaretleme teknikleri, jel elektroforezi, tek hücre jel elektroforezi (Comet assay), alkali ile DNA çift sarmalının çözünmesi tekniği, süper sarmal plazmid DNA kullanımı tekniği ve ELISA'dır. DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de zincir kırıkları meydana gelebildiğinden zincir kırığı ölçümü her zaman oksidatif DNA hasarını doğru olarak yansıtmayabilir (Cooke *et al*. 2002, Forlenza and Miller 2006)

DNA'da oksidatif hasarın saptanması amacıyla yapılan bir çok araştırmada, modifiye bazlar analiz edilmektedir.

En sık ölçümlenen oksidatif DNA baz hasar göstergesi 8-OH-Gua ve onun deoksiriboz bağlı şekli olan 8-OHdG'dir. Oksidatif DNA baz hasarının ölçümü ya idrar ile atılan DNA onarım ürünleri ölçülerek saptanır ya da doğrudan baz hasarı analizlenir.

2.9.1 Kan ve idrar ile atılan DNA hasar ürünlerinin ölçümü

8-OHdG, timinglikol, 5-hidroksimetilurasil, 8-hidroksiadenin ve 7-metil-8-hidroksiguanin gibi çeşitli DNA baz hasar ürünleri memelilerde idrar ile atılır. Bu ürünlerin idrar ile atılan miktarlarının, onarım aktivitesini gösterdiği kabul edilmektedir. 8-OHdG DNA'dan genellikle enzimatik hidroliz ile serbestleştirilir (Kasai 1997).

GC-MS (gas chromotography-mass spectroscopy) tekniği, 8-OH-Gua de dahil olmak üzere, oluşan tüm baz ürünlerinin karakterizasyonunda kullanılmıştır. GC-MS tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda DNA genelde formik asitli ortamda ısıtılarak hidroliz edilir. DNA hidrolizatında bulunan hasar ürünleri gaz kromatografisi ile ayrılır ve kütle spektrometrisi ile tespit edilir.

Özgün enzimler, DNA'yı modifiye bazların bulunduğu noktalardan kırarak yeni tek zincir kırıkları oluşturur. 8-OHdG ve diğer guanin ürünlerini tanıyan onarım enzimi olan FAPy glikosilaz (FpG protein) kullanılır. Enzimatik işlemden önce ve sonra saptanan zincir kırıklarının karşılaştırılması ile okside bazlar ölçülür. Zincir kırıkları alkali elüsyon, nick translasyon, tek-hücre jel elektroforezi gibi yöntemlerle saptanır.

^{32}P-Post-Labeling tekniğinde DNA nükleaz ve fosfodiesterazlar ile nükleotid monofosfatlara hidroliz edilir. Nükleotid monofosfatlar polinükleotid kinaz ve radyoaktif işaretli ATP ile inkübe edilerek 5' pozisyonunda fosforillenerek işaretlenirler. 5' pozisyonunda fosfor ile işaretli deoksinükleotidler ince tabaka kromatografisi ile birbirinden ayrılır ve otoradyografi ile tespit edilir.

HPLC (high performance likid chromotography) sistemi maddelerin hareketli (mobil faz; gaz veya likid olabilir) ve sabit olan bir faz (stastoner faz; likid ya da solid olabilir) arasında dağılması esasına dayanan bir ayrım yöntemidir. Kalitatif ve kantitatif analize olanak sağlar (Toyokuni *et al*. 1997).

2.9.2 ELISA yöntemi

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim subtratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem; antijen, antikor ve haptenlerin saptanmasında kullanılan kantitatif bir tekniktir.

ELISA'nın son zamanlarda yaygın olarak kullanılması, monoklonal antikorların yaygınlığına ve hem otoimmün hem de infeksiyöz hastalıklar için birtakım rekombinant spesifik antijenlerin geliştirilmiş olmasına bağlanmaktadır.

ELISA'da kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması, otomatize edilebilmesi ve ticari plak okuyucuları ile 1 dk'da değerlendirilebilmeleri bugün laboratuarda kullanılan birçok tekniğe olan üstünlükleridir. ELISA'nın laboratuarda çok fazla örnekle çalışma imkanı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır. ELISA bazı organizmaların saptanmasında kültür kadar güvenilir değildir ancak Hepatit, AIDS, kızamık gibi hastalıkların, hormonlar, kanser markerleri, hematolojik ve bakteriyolojik determinantların tanısında ve birçok klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Sönmez 2003, Cooke *et al.* 2002, Saito *et al.* 2000).

2.9.2.1 ELISA bileşenleri

Bütün ELISA testleri kompleks, birden fazla içeriği olan sistemlerden oluştuğundan ve bu içeriklerin duyarlı ve kesin sonuçlar alınmasını direkt etkilemelerinden dolayı, test parametrelerinin ve içeriklerinin dikkatlice seçilmesi gerekmektedir.

i. Katı faz

İmmünreaktiflerin antijen ya da antikorun bağlandığı katı faz, daha sonra oluşacak olan antijen-antikor reaksiyonlarının kendine bağlı kalmasını sağlar. Katı faza bağlanmayı etkileyen faktörler şunlardır; katı fazın yapısı, antijenin fiziksel özellikleri, izoelektrik noktası, kimyasal yapısı, immünreajenlerin konsantrasyonu ve saflığı, kaplama için gerekli ısı ve inkübasyon periyodu, kaplama solüsyonunun iyonik gücü ve pH'dır.

ii. Konjugat

Yönteme bağlı olarak ELISA, enzimle işaretli antijen veya antikor içermelidir. Konjugat kullanılırken antikorun enzimle işaretlenmesi kolay olduğu için daha sıklıkla antikor kullanılır. Klinik immünoloji laboratuarlarında en yaygın olarak kullanılan enzimler alkaline fosfataz ve horseradish peroksidaz'dır. Bunun dışında ß galaktosidaz, glukoz oksidaz, üreaz, karbonik anhidraz, lizozim, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzim olarak kullanılabilir.

iii. Substrat

Subsrat, enzimle reaksiyona giren ve böylece renk değişikliğine uğrayan maddedir. Kullanılan enzime bağlı olarak kullanılan substrat, floresan, radyoaktif, kemilüminiset, kromojenik karakterli olabilir Substrat enzime spesifiktir. Öncelikle substrattan ölçülebilir ve çözünür bir reaksiyon ürünü oluşmalıdır. Bu ürün renkli olup gözle ya da spektrofotometre ile tespit edilebilir. En yaygın kullanılan substratlar O-fenilendiamin (OPD), 5-aminosalisilik asit, Azido-benzo-thiazolidin-sülfat (ABTS), 3-3', 5-5' Tetrametilbenzidin (TMB), alfa-naftol ve toluidin'dir.

2.9.2.2 ELISA yöntemleri

Antijen ve antikor bağlanması özgül olduğu için örnekte aranılan antijen ya da antikorların varlığı, miktarı ve cinsi kendileri için özgül olan antijen ya da antikorlar kullanılarak saptanabilir. Değişik şekilde tanımlanan ELISA yöntemleri bulunmaktadır.

2.9.2.2.1 Direkt ELISA

Direkt ELISA non kompetatif yöntemin en basit formudur. Antijen katı faza pasif absobsiyon ile bağlandıktan sonra enzimle işaretli antikor eklenir. Bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılmaktadır. Yıkama safhasının ardından substrat eklenerek renk değişimi izlenir. Bu yöntem öçülecek her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirir. Bu da birçok farklı antijenin saptanması gereken durumlarda sorun oluşturur.

2.9.2.2.2 İndirekt ELISA

İndirekt yöntem antikor saptanmasında ve ölçümünde kullanılan en basit yöntemdir. En önemli avantajı direkt yöntemde olduğu gibi her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirmemesidir. Tek bir işaretli antiglobulin ile çok sayıda farklı antijen test edilebilir. İndirekt yöntemtan insan ve hayvan infeksiyonlarında, antikor ölçümünde geniş anlamda yararlanılmaktadır.

2.9.2.2.2.1 İndirekt yöntemde antijen aramaya yönelik testler

Antijen aramaya yönelik testlerde çeşitli modifikasyonlar vardır.

a. Sandviç yöntem

ELISA yöntemlerinden en çok kullanılan sandviç yöntemidir. Katı faz antijene karşı oluşmuş antikor ile kaplanır. İncelenecek örnek eklenir. İnkübasyon sırasında örnekte, katı fazdaki antikora spesifik antijen varsa solid faza bağlanır ve yıkanır. Daha sonra antijene spesifik antikorlar eklenir. Serbest antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra 2. antikorun hazırlandığı türe spesifik enzimle işaretli antikorlar eklenir. Son olarak enzim substratı eklenerek renk değişimi izlenir. Oluşan rengin şiddeti antijen miktarı ile doğru orantılıdır.

b. Kompetatif ELISA

ELISA testinde, antijen varlığını gösterebilmek için aranan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve antijen içerdiği düşünülen klinik örnek katı faza bağlı antikora aynı anda eklenir ve her iki antijenin antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. Eğer enzimle işaretli antijen katı fazdaki antikora bağlanmışsa yıkama işleminden sonra eklenen substrat hizdrolize olarak renk değişikliğine yol açar. Ancak klinik örnekte aranılan antijen mevcutsa katı fazdaki özgül antikora bu antijen bağlanacağından pozitif sonuç renk değişikliğinin olmaması ile ortaya çıkar. Bu tip yöntemler yüksek konsantrasyondaki antijenlerin ölçümünde ve ayrıca antikorlar için tek bir bağlanma bölgesi bulunan hormonların tespitinde kullanılır. Kolay, hızlı ve inkübasyon sayısı azalmış bir testtir. Nonkompetatif yöntem ile kıyaslandığında, kompetatif yöntem daha spesifiktir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hastaların seçimi

Araştırmaya HÜTF Endokrinoloji ve Metabolizma Ünitesinde takip edilen 26-66 yaş grubundaki hastalar alındı. Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı olan hastaların araştırmaya kabul edilmeden önceki 3 ay içerisinde antitiroid tedavi, tiroid hormon tedavisi ve/veya radyoaktif iyod tedavisi almamış oldukları belirlendi. Kanserli hastalar, akut ve kronik hastalıkları olanlar (diabetes mellitus, karaciğer hastalıkları, böbrek hastalıkları, vs.) ve ilaç, sigara ya da alkol kullananlar çalışma dışı bırakıldı.

3.1.2 Hasta sayısı, hastalardan kan örneklerinin toplanması ve saklanması

Araştırmaya daha önce tedavi görmemiş 13 Hashimoto tiroiditli (grup 1) ve 7 tane Graves hastalığı (grup 2) olan hasta alındı. Kontrol grubunu ise benzer yaş ve cinsiyette 15 sağlıklı normal kişi (grup 3) oluşturuldu. Kontrol grubunu oluşturan kişiler de dahil olmak üzere toplam 35 kişinin serbest T_3 ve T_4, TSH, anti TPO, TSH reseptör antikor ve antiTg antikor seviyeleri tedaviden önce belirlendi. Daha sonra toplam 10 hastaya (8 Hashimoto tiroidit ve 2 Graves hastalığı) uygun tedavi verilerek tedavi sonrası alınan kan örneklerinde 8-OHdG, serbest T_3 ve T_4, ve TSH reseptör seviyeleri ölçüldü. Hastalardan aç karnına alınan kan örnekleri 2000 g de ortalama 10 dk santrifuj edilerek elde edilen supernatant kısım (serum) daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -70ºCde saklanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Serumda 8-OHdG miktarının ölçümü

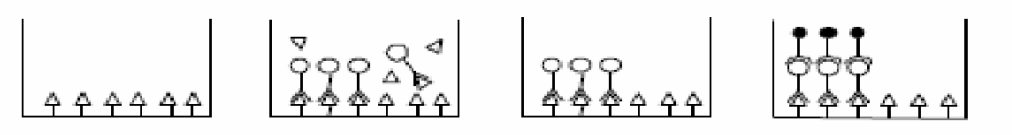
Bir oksidatif hasar biyomarkerı olan 8-OHdG'nin serumdaki miktarını ölçmek için çalışmamızda OXIS KIT (OXIS, BIOXYTECH 8-OHdG EIA KIT, Portland, USA) kullanılmıştır. Rekabetçi bir ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti olan Bioxytech 8-OHdG-EIA kiti, DNA molekülündeki oksidatif hasarın doku, serum, plazma ve idrarda kantitatif ölçümü için de uygundur. ELISA çalışması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. ELISA laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce – 70°C'de muhafaza edilen serum örnekleri oda ısısına gelene kadar bekletildi. Çözünen her bir serum, büyük moleküler ağırlıktaki maddelerin uzaklaştırılması amacıyla Amicon Ultra Santrifüj filtrelerinden (cut off 10,000) geçirilmiştir. Her bir serum 2 mL'lik filtrelere konularak 5300 rpm'de 15 dk santrifüj edildi (Forlenza and Miller 2006).

1) Birincil antikor dilüsyon tamponu (phosphate buffered saline) kullanılarak birinci antikor hazırlandı ve bu karışımdan 50 µL ve serum örneklerinden 50 µL, daha önceden 8-OHdG ile kaplanmış mikroplaka kuyucuklarına yüklendi, 37°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kenar etkisini önlemek amacıyla en dıştaki paralel kuyucuklar (A ve H) kullanılmadı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank			X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	0.5 ng/mL											
C	2.0 ng/mL											
D	8.0 ng/mL											
E	20.0 ng/mL											
F	80.0 ng/mL											
G	200.0 ng/mL											
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Standart veya örnekdeki 8-OHdG, plakada bağlı bulunan 8-OHdG ile 8-OHdG monoklonal antikor bağlanma bölgesi için rekabet edecektir. Dolayısıyla, örnek solusyonundaki yüksek 8-OHdG konsantrasyonu antikorun, plakada bulunan 8-OHdG'ye bağlanma verimliliğini azaltacaktır.



2) Tüm kuyucuklar 250µL seyreltilmiş yıkama solüsyonuyla (concentrated phosphate buffered saline) iki kez yıkanarak örnekdeki 8-OHdG'ye bağlanmış antikorların kuyucuklardan uzaklaşması sağlanmıştır. Plakada bulunan 8-OHdG'ye bağlı olan antikorlar ise kuyucuklarda kaldı.

3) İkinci antikor dilüsyon tamponu ile hazırlanmış olan ve HRP enzimi ile işaretli ikinci antikor'dan 100µL tüm kuyucuklara yüklendi. 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakılarak plakada kalan monoklonal antikorlara bağlanması sağlandı.

4) Bağlanmamış enzim işaretli ikinci antikorları uzaklaştırmak için tüm kuyucuklar 250µL seyreltilmiş yıkama solüsyonuyla (concentrated phosphate buffered saline) iki kere yıkanmıştır.

5) Yıkama işlemini takiben, kromojen dilüsyon tamponu (hydrogen peroxide/citrate-phosphate buffered saline) ile seyreltilerek hazırlanmış kromojen solusyonundan 100µl her bir kuyucuğa eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

   Kromojen plakada bulunan bağlı antikor miktarı ile doğru orantılı olarak renk oluşumuna sebep olmaktadır (HRP enzimi hidrojen peroksiti parçalıyor ve açığa çıkan oksijen substratı -- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin -- okside ederek renk değişimine sebep oluyor).

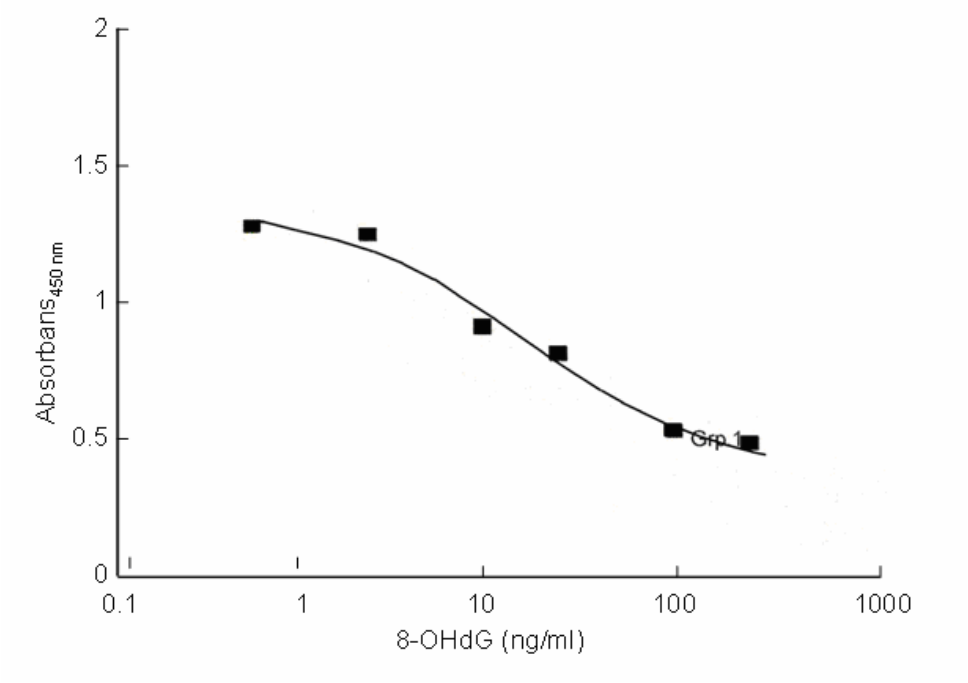
6) Renk reaksiyonunu durdurmak için 1M fosforik asit eklendi ve 3 dk beklendi.

7) 450 nm' de absorbans değerleri mikroplaka okuyucusu kullanılarak kör'e karşı ölçüldü.

8) Örnekteki 8-OHdG konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış "kalibrasyon eğrisi" kullanıldı. Sonuçlar mililitrede nanogram (ng/mL) olarak ifade edildi ve istatistik proğramlarından biri olan SPSS (statistical package for the social sciences) paket programı kullanılarak istatistik analizler gerçekleştirildi. İnkübasyon öncesi her basamak sırasında plakalar "plaka kaplayıcı" ile kaplanarak hafifçe sallandı.

4. BULGULAR

Standart eğri ELISA kiti içinde mevcut olan standardize edilmiş örneklerden elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Standart kalibrasyon eğrisi

Hashimoto tiroiditi (grup 1), Graves hastalığı (grup 2) ve kontrollerdeki (grup 3) 8-OHdG düzeyleri sırası ile 0.404±0.249 ng/mL, 0.375±0.398 ng/mL ve 0.277±0.096 ng/ml olarak tespit edildi. Serum 8-OHdG düzeyi Hashimoto tiroiditi (0.404±0.25 ng/ml) ve Graves hastalığında (0.375±0.39 ng/mL) kontrollere (0.277±0.09 ng/mL) oranla fazla çıkmasına rağmen, 8-OHdG değerleri arasında anlamlı fark ANOVA testi ile gösterilemedi (p= 0,361) (Çizelge 4.1) (Şekil 4.2). Toplam 10 hastanın tedavi öncesi ve sonrası, 8-OHdG değerleri arasındaki fark ise "**student's t**" testi ile incelendi. Tedavi öncesi ve sonrası, 8-OHdG miktarları arasında p=0,016 olarak bulundu ve anlamlı olarak kabul edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1 Hasta gruplarının yaş, cinsiyet, tiroid hormon, tiroid otoantikor ve 8-OHdG düzeyleri

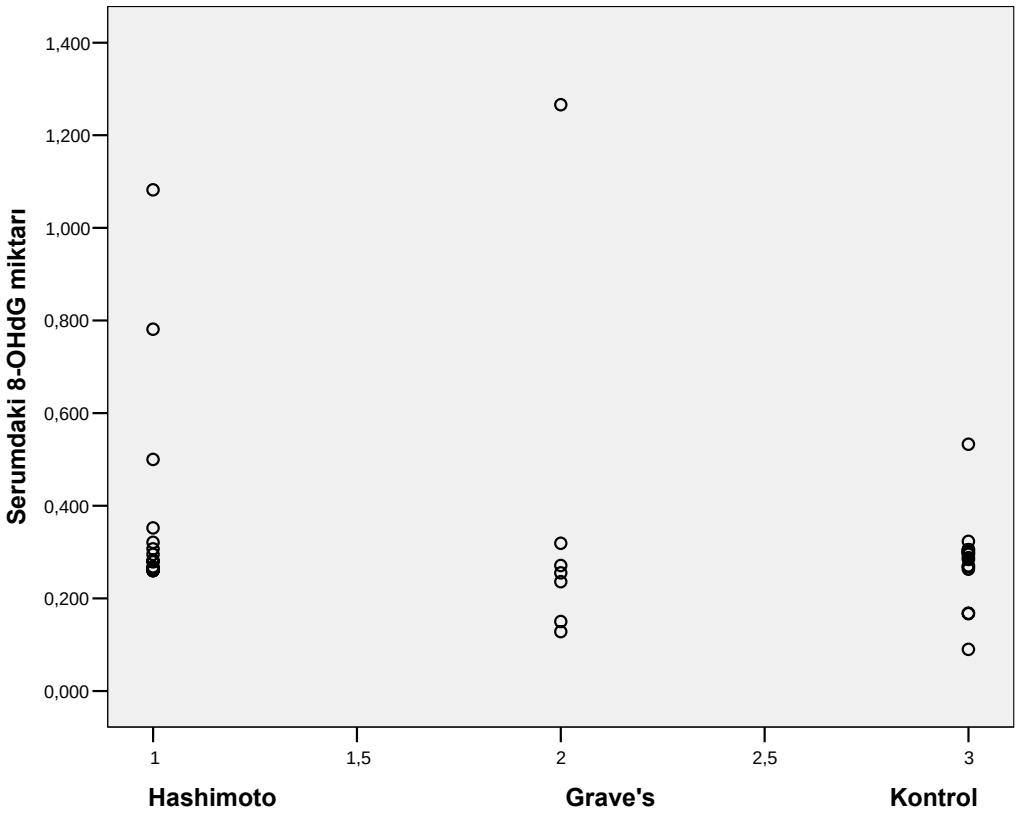
	Hashimoto tiroiditi	**Graves hastalığı**	**Kontrol**
n	13	7	15
K/E	11/2	4/3	7/8
Yaş (yıl)	48.0±11.8	39.5±13.28	39.1±7.32
Boy (cm)	163.6±5.07	161.6±4.61	172.8±10.91
Kilo (kg)	77±13.50	49.3±6.80	75.4±17.47
ST_3 (pmol/L)	4.783±2.960	20.587±10.815	5.109±1.543
ST_4 (pmol/L)	12.937±12.982	48.214±30.034	14.906±5.180
TSH (IU/mL)	45.748±36.296	0.0087±0.0036	4.506±6.370
Anti TPO (IU/mL)	1731.26±1314.82	612.01±1186.81	13.1±3.09
Anti TG (IU/mL)	25768.58±86372.15	37.1±34.2	28.846±29.022
TSH reseptör(IU/mL)	8.87±20.45	22.35±25.73	3.5±2.56
8-OHdG (ng/mL)	0.404±0.249	0.375±0.398	0.277±0.096

(Sonuçlar; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. n; sayı, K/E; kadın/erkek)

Çizelge 4.2 Tedavi öncesi ve sonrası tiroid hormon ve 8-OHdG düzeyleri

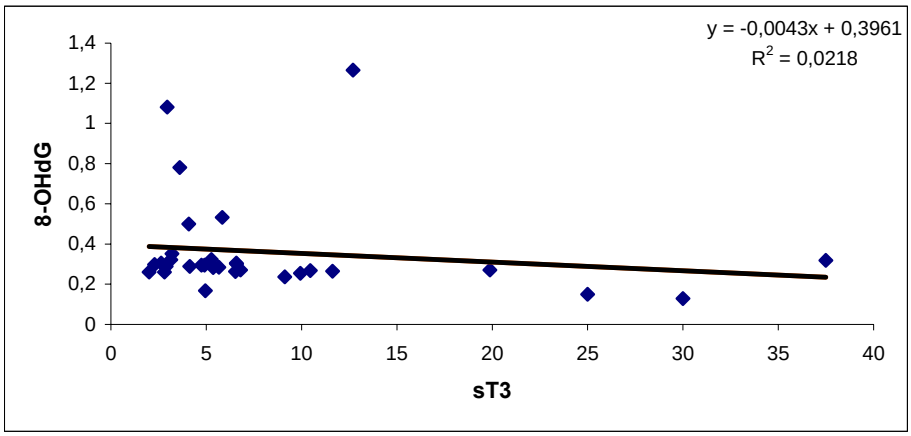
	Tedavi öncesi	**Tedavi sonrasi**
n	10	10
ST_3 (pmol/L)	9.535 ± 10.304	4.781 ± 0.946
ST_4 (pmol/L)	26.210 ± 29.656	14.502 ± 5.605
TSH (IU/mL)	29.573 ± 34.322	3.463 ± 6.977
8-OHdG (ng/mL)	0.316 ± 0.071	0.229 ± 0.076

(Sonuçlar; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.)

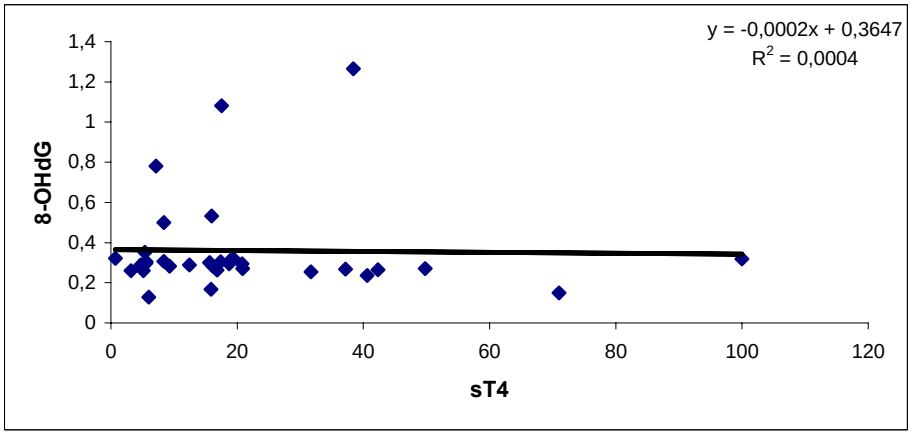


Şekil 4.2 Hashimoto (n= 13), Graves (n=7) ve Kontrol grup (n= 15) serumlarında 8-OHdG miktarı (p= 0,361)

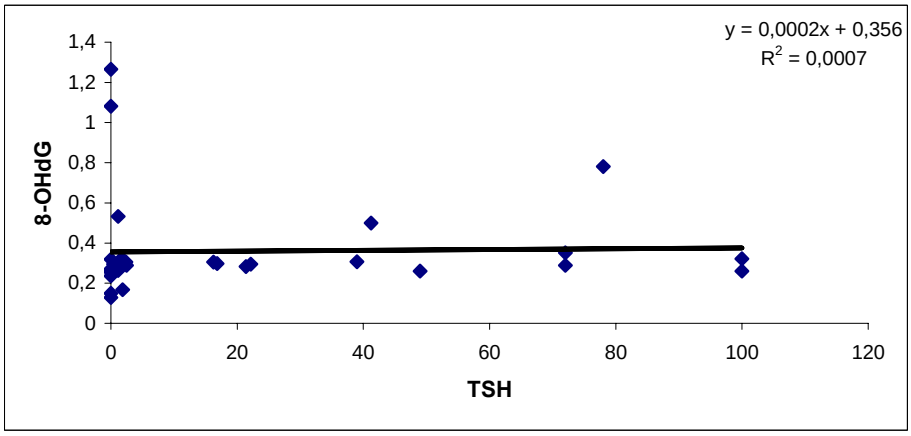
Serumda toplam ST_3, ST_4 ve TSH değerleri ile 8-OHdG arasındaki korelasyon katsayıları ve anlamlılık dereceleri Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Serumda ST_3 ve 8-OHdG arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi ($r = - 0,147$, $p>0.05$) (Şekil 4.3). Serumda ST4 ve 8-OHdG arasında da anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi ($r= -0,019$, $p>0.05$) (Şekil 4.4). Serum TSH ve 8-OHdG arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmedi ($r= 0,025$, $p>0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.3 Serumda ST_3 ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = -0,14751)



Şekil 4.4 Serumda ST_4 ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = -0,01938)



Şekil 4.5 Serumda TSH miktarı ve 8-OHdG arasındaki korelasyon (r = 0,025623)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatür bilgilerine göre reaktif oksijenler, endokrin bezlerinin otoimmün hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynarlar. Buna bağlı olarak bir DNA hasar biyomarkerı olan 8-OHdG'nin otoimmün tiroid hastalıklarının tanısında ve tedavi takibinde kullanılabileceği düşüncesi doğmuştur. Tiroid hormonları, bazal metabolizmayı hızlandırır. Hormon miktarındaki artış, oksijen tüketimi ve ısı üretimini arttırır. Bu etkiler de bazal metabolik hızdaki artışa neden olurlar, dolayısıyla serbest radikal olan süperoksit anyon düzeyleri artmış olur. Bu durum sıçan kalp mitokondrisinde yapılan çalışmada gösterilmiştir (Lopez-Torres *et al.* 2000). Hipertiroidili hastalarda oksijen tüketim oranının arttığı gözlemlenmiştir (Bianchi *et al.* 1999). Bu metabolik durum, serbest radikal üretimindeki artıştan kaynaklanan oksijen toksisitesi ile sonuçlanır. Hipertiroidli hastalarda serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonunun artması, bu hastalarda serbest radikallerin bu dokularda zarara neden olduğunu göstermiştir (Komosinska-Vassev *et al*. 2000). Graves hastalığı ve Hashimoto tiroiditi olan hastaların mononükleer hücre kültürlerinde 8-OHdG ve sitokrom c yapımı incelenmiştir (Komosinska-Vassev *et al.* 1995, Hara *et al*. 2001). Tedavi edilmemiş Graves hastalarının mononükleer hücre kültürlerinde 8-OHdG ve sitokrom c düzeylerinin sağlıklı kişilere göre artmış olduğu saptanmıştır. 8-OHdG and ST_4 düzeyleri arasında da korelasyon bulunmuştur. Böylece tiroid fonksiyonlarının oksidatif stresi etkilediği tespit edilmiştir.

Otoimmün tiroid hastalıklarında çok sayıda deneysel ve klinik araştırma olmasına rağmen, serumda okdisatif DNA baz hasarı olan 8-OHdG'nin ölçümü ilk kez çalışılmıştır. DNA çok kararlı bir molekül olmasına karşın spontan olarak hasara uğradığı bilinmektedir. DNA'da oksidatif lezyonların onarımı için enzim sistemlerinin bulunması ve hasarlı baz ürünlerinin serum ve idrar ile atılımı DNA'nın oksidatif hasara uğradığını gösteren *in vivo* kanıtlardır. Bu hasar çok düşük düzeylerde sağlıklı bireylerde de saptanır.

Çalışmamızda Hashimoto tiroiditli hastalarda ve Graves hastalarında ortalama 8-OHdG düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmakla birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemesi, grupları oluşturan hasta sayısının azlığı ile açıklanabilir. Tiroid hormon düzeyleri ile 8-OHdG düzeyleri arasında korelasyon tespit edilmemesi, çalışılan hasta gruplarında tiroid hormon düzeyleri ile DNA'nın oksidatif hasarı arasında ilişki olmadığını göstermiştir. Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalarında tedavi sonrasında 8-OHdG düzeylerinin azalması, otoimmün kökenli bu tiroid patolojilerinin oluşumunda oksidatif DNA hasarının rol oynadığını düşündürür.

Araştırma sonucunda elde edilen verilerle Graves hastalığı ve Hashimoto tiroiditi gibi iki önemli otoimmun tiroid hastalığında antiroid tedavinin ve tiroid hormon tedavisinin oksidatif DNA hasarı üzerinde var olduğu düşünülen etkileri ortaya konmuştur. Hasta grupları arasında oksidatif hasar bakımından bir fark saptanmamış olması çelişki varlığı olarak yorumlanmamalıdır. Çünkü birçok hastalıkta olduğu gibi otoimmün tiroidit hastalıklarında da prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kaymasına bağlı olarak artan oksidatif DNA hasarının onarımında da yetersizlik olduğu düşünülebilir. Onarımda yetersizlik, onarım enzimlerinin glikasyona uğramaları sonucunda inaktive olmalarından ve/veya DNA'nın ileri glikasyon nedeni ile onarım enzimlerine karşı dirençli olmasından ileri gelebilir. DNA'dan bu hasarın onarılamaması sonucu serum veya idrarda tespit edilememesi doğaldır. DNA hasarlarından biri olan 8-OHdG hem tiroid dokusunda hem de serumda çalışılarak hasar miktarı karşılaştırılabilir, hasar ve onarım seviyesi arasındaki ilişki tespit edilebilir. Bununla beraber, hasta sayısının arttırılması ve doku değerlendirmesi ile daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Bundan sonraki çalışmalar bizi bu hasta gruplarında DNA onarım enzimlerinin işleyişi hakkında araştırmaya sevk edecektir.

KAYNAKLAR

Alıcıgüzel, Y., Özdem, N.Ö., Özdem S.S., Karayalçın, Ü., Siedlak, L.S., Perry, G. and Smith, A.M. 2001. Erythrocyte, plasma, and serum antioxidant activities in untreated toxic multinodular goiter patient, Free Radical Biology & Medicine, 30, 665-670.

Asayama, K. and Kato, K. 1990. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. Free Radical Biology & Medicine, 8, 293-303.

Bednarek, J., Wysocki, H. and Sowiński, J. 2004. Peripheral parameters of oxidative stres in patients with infiltrative Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids. Immunology Letters, 93, 227-232.

Bianchi, G., Solaroli, E., Zaccheroni, V., Grossi, G., Bargossi, A.M., Melchionda, N. and Marchesini, G. 1999. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: Effect of treatment. Hormone and Metabolic Research, 31, 620-624.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. 1991. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G→T and A→C substitutions. .Journal of Biological Chemistry, 267;1, 166-172.

Cooke, MS., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. The FASEB Journal, 17, 195-214.

Cooke, M.S., Lunec, J. and Evans, M.D. 2002. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. Free Radical Biology & Medicine, 33, 1601-1614.

Dizdaroglu, M. 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. Free radical Biology & Medicine, 10, 225-242.

Erdoğan, G. 2003. Klinik Endokrinoloji, 3.baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, Ankara.

Erhola, M., Toyokuni, S. and Okada, K. 1997. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radio-therapy, chemotherapy and response to treatment. FEBS Letter, 409, 287-291.

Floyd, R.A. 1990. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. Carcinogenesis, 11; 9, 1447-1450.

Fung, H., Kow, Y.W., Houten, B.V. and Mossman, B.T. 1997. Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stres in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. Carcinogenesis, 18;4, 825-832.

Forlenza, M.J. and Miller, G.E. 2006. Increased serum Levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in clinical depression. Psychosom Medicine, 68;1, 1-7.

Halliwell, B. 2002. Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker? Free Radical Biology & Medicine, 32, 968-974.

Halliwell, B. and Auroma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Letter, 281, 9-19.

Halliwell, B. and Guitteridge, J.M.C. 2005. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford Science Publications Pres Inc., London.

Halliwell, B. and Gutteridge J.M. 1984. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. Lancet; 2; 1095.

Halliwell, B. and Dizdaroglu, M. 1992. "Commentary: The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques". Free Radical Research Commuications, 16, 75-87.

Hara, H., Sato, R. and Ban, Y. 2001. Production of 8-OHdG and cytochrome c by cultured human mononuclear cells in patients with autoimmune thyroid disease. Endocrinology Journal, 48, 671-675.

Helbock, H.J., Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods in Enzymology, 300, 156-166.

Kasai, H. and Nishimura, S. 1984a. Hydroxilation of deoxyguanosine at the C-8 position by polphenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. Gann, 75, 565-566.

Kasai, H. and Nishimura, S. 1984b. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. Nucleic Acid Research, 12;4, 2137-2145.

Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutation. Research, 387, 147-163.

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, K., Kucharz, E.J., Marcisz, C., Winsz-Szczotka, K. and Kotulska, A. 2000. Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. Clinica Chimica Acta, 300, 107-117.

Lopez-Torres, M., Romero, M. and Barja, G. 2000. Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. Molecular and Cellular Endocrinology, 168, 127-134.

Rios, A. and Rodriguen, J.M. 2004. Risk factors for malignancy in multinodular goitres. Europen Journal of Surgical Oncology, 30, 58-62.

Saito, S., Yamauchi, H., Hasui, Y., Kurashige, J., Ochi, H. and Yoshida, K. 2000. Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine (8-OH-dG) by using ELİSA. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 107, 39-44.

Shigenaga, M., Gimeno, C. and Ames, B.N. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. Proceedings of The National Academy of Science, 86, 9697-9701.

Sharpe, M.A., Robb, S.J. and Clarck, J.B. 2003. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. Journal Neurochemical, 87;2, 386-94.

Simic, M.G. 1994. DNA markers of oxidative process in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. Carcinogenesis, 54 (suppl), 1918-1923.

Sönmez, C. 2003. In house ELISA kitinin düşük düzeyde tetanoz antitoksik antikorlarının saptanması amacıyla iyileştirilmesi. Uzmanlık tezi (basılmamış), Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, mikrobiyoloji ve klinik mikrobiyoloji bölümü, 75 s., Ankara.

Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.H., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura S. 1991. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88;11, 4690-4694.

Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., Nishiyama, Y., Yoshida, A., Uchida, K., Hiai, H., Ochi, H. and Osawa, T. 1997. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to

ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. Laboratory. Investigation, 76, 365-374.

Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W. 2002. Fundamentals of biochemistry. John Wiley & Sons Inc., United States of America.

Wiseman, H. and Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, 313, 17-29.

Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y. and Wu, J.T. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clinica Chimica Acta, 339, 1-9.

Yin, B., Whyatt, R.M., Perera, F.P., Ranzincirl, M.C., Cooper T.B. and Santella, R.M. 1995. Determination of 8-Hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. Free Radical Biology & Medicine, 18, 1023–1032.

EK 1 KİMYASALLARIN LİSTESİ ve MARKALARI

BIOXYTECH® 8-OHdG-EIA **Kit İçerikleri**

(8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Kantitatif Analizi)

Kimyasal Adı	Özelliği	Miktar
8-OHdG Mikrotiter Plate	8-OHdG kaplı 8x12 kuyucuk	1 plate
Primer Antibody	8-OHdG için spesfik monoklonal antibody	1 vial
Primer Antibody Dilüsyon Solüyonu	Phosphate Buffered Saline	6 mL
Sekonder Antibody	HRP-Conjugated Antibody	1 vial
Sekonder Antibody Dilüsyon Solüsyonu	Fosfat Buffered Saline	12 mL
Kromojen	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine	250µL
Kromojen Dilüsyon Solüsyonu	Hidrojen Peroksit/Sitrat-Fosfat Buffered Saline	12 mL
Washing Buffer (5x)	Konsantre Fosfat Buffered Saline	2 at 26 mL
Stop Solüsyonu	1M Fosforik Asit	12 mL
Standartlar 1-6	0.5, 2.0, 8.0, 20.0, 80.0, 200.0 ng/ml 8-OHdG (her biri için 1 vial)	1 mL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İLKNUR ALTUNTAŞ

Doğum Yeri: Kırşehir

Doğum Tarihi: 10.07.1980

Medeni Hali: Bekar

e-mail: ilknuraltuntas@gmail.com

Yabancı Dil: İNGİLİZCE

► EĞİTİM

Lise:	Antalya Aldemir Atilla Konuk Lisesi	1995-1998
Lisans:	Ankara Ünv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü	1999-2003
Yüksek Lisans:	Ankara Ünv. Fen Bilimleri Enstitüsü	
	Biyoloji Anabilim Dalı	2004-2007

► PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER:

TAMAMLANAN PROJELER:

1. **Otoimmün tiroid hastalığının tanı ve takibinde oksidatif DNA hasar belirleyicisi 8-OHdG'nin önemi**

   TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Alt Yapı Destekleme Projesi, 2005-2006 Yardımcı Araştırıcı,

   PROJE NO: **104S078** (SBAG-AYD-467)

DEVAM ETMEKTE OLAN PROJELER:

1. **Vakum ile paketlenen ticari et ve et ürünlerinde gıdaların bozulmalarına sebep olan ve bakteriyosin üreten *anti-Listerial Leuconostoc* suşlarının izolasyon, identifikasyon ve karakterizasyonları.**

   TÜBİTAK Tarım ve Hayvancılık Araştırma Grubu Destekleme Projesi, 2005- Yardımcı Araştırıcı.

   PROJE NO: **104O498**

► BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA (*PROCEEDINGS*) BASILAN POSTER BİLDİRİLERİ

A. ULUSLAR ARASI

A1. Osmanağaoğlu Ö, **Altuntaş İ.** , Kıran F **.** "*Lactobacillus plantarum* OZ isolated from beer produces bacteriocin" **1th International Food and Nutrition Congress**, İstanbul, Turkey, June 15-18, 2005.

A2. **Altuntas I,** Osmanagaoglu O, Dagdelen S, Isildak M, Durusoy M, Erbas T. "The importance of 8-OHdG, an oxidative damage indicator, in the diagnosis and treatment of autoimmune thyroiditis". **3rd International Conference On Oxidative Stress In Skin Biology and Medicine,** 21-24 September, Page 82, Andros, Greece. (2006)

B. ULUSAL

B1. Osmanağaoğlu Ö, Kıran F, and **Altuntaş İ**., "Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin fizikokimyasal karakterizasyonları" **19.Ulusal Biyokimya Kongresi,** 22-25 Nisan, Antalya, Türkiye. Sayfa 133 (2005).

B2. Osmanağaoğlu Ö, **Altuntaş İ,** Yıldırım T., "Geleneksel Bir Türk İçeceği Olan Boza'dan İzole Edilen *Pediococcus pentosaceous* Ak12 Suşu Tarafından Üretilen Anti-*listerial* Bakteriyosin, Pediocin Ak" **19. Ulusal Biyokimya Kongresi,** 22-25 Nisan, Antalya, Türkiye. Sayfa 132 (2005).

► KATILDIĞI BİLİMSEL KURSLAR

1. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **"Serbest Radikaller, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi"** 24-28 Ocak 2005. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İZMİR.

► KATILDIĞI BİLDİRİSİZ BİLİMSEL TOPLANTILAR

1. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, **''II. Ulusal HPLC ve Diğer Seperasyon Teknikleri Sempozyumu''**. 07-09 Ekim 2004. GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA.