

RYSZARD OLIŃSKI i MAREK JURGOWIAK

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej
Akademia Medyczna im. L. Rydygiera
Kartowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
e-mail: ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl
marek@aci.amb.bydgoszcz.pl

OKSYDACYJNE USZKODZENIA DNA (8-oksodG) — BIOMARKEREM NIEKTÓRYCH CHOROÓB CZŁOWIEKA

Jednym z wielu paradoksów życia jest fakt, że tlen który jest niezbędny dla istnienia organizmów aerobowych może być jednocześnie dla nich toksyczny. Ta druga, „mroczna twarz” tlenu związana jest z tworzeniem reaktywnych form tlenu (RFT), a wśród nich wolnych rodników tlenowych (WRT). Dokładne dane o wolnych rodnikach tlenowych znajdzie czytelnik w publikacjach książkowych: BARTOSZ (1995) oraz OLIŃSKI i JURGOWIAK (1996).

Wolne rodniki tlenowe mogą powstawać zarówno endogennie, jako produkt uboczny przemian metabolicznych, jak i mogą dostawać się do komórki ze środowiska zewnętrznego (źródła

Tabela 1. Endogenne źródła RFT.

Źródło (enzym lub system)	Produkt
1. Fosforylacja oksydacyjna w mitochondriach	O_2^{\bullet}
2. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	H_2O_2
3. Oksydaza monoaminowa (mózg)	H_2O_2
4. Oksydaza ksantynowa	O_2^{\bullet} , H_2O_2
5. Oksydaza NADPH neutrofilii	O_2^{\bullet}
6. Reakcja Fentona (z udziałem jonów Fe^{+2} i Cu^{+1})	$\bullet OH$
7. Syntaza tlenu azotu	NO^{\bullet}

Dodatkowo RFT mogą być generowane w stanie stresu fizjologicznego i psychicznego oraz na skutek uszkodzeń komórek i w stanie ischemii/reperfuzyj na przykład po zabiegach operacyjnych.

egzogenne) (Tabela 1 i Tabela 2). Przyjmuje się obecnie, że w zdrowym organizmie człowieka rocznie powstawać może do 2 kg anionorodnika

Tabela 2. Egzogenne źródła RFT.

1. RFT przyjmowane z pokarmem
— dieta bogata w tłuszcze
— ksenobiotyki
2. Zanieczyszczenia środowiskowe
— dym papierosowy
— SO_2 , NO_2 , NO^{\bullet} , O_3 , policykliczne węglowodory aromatyczne
— zanieczyszczenia związane z wykonywanym zawodem: niektóre metale (np. Cu, Ni, Cd,) azbest, parakwat
3. Niektóre leki (np. z grupy adriamycyny)
4. Promieniowanie
— jonizujące
— UV
— mikrofałe

ponadtlenkowego (O_2^{\bullet}). Dorosły człowiek (o masie ciała 70 kg), w spoczynku wykorzystuje 3,5 ml O_2 /kg/minutę lub 352,8 l/dzień lub 14,7 mola/dzień. Jeżeli 1% tlenu pojawia się w formie O_2^{\bullet} to: w trakcie jednego dnia wytwarza się 0,147 mola tego rodnika i w okresie 1 roku — 53,66 mola (około 1,72 kg). Podczas wzmożonego wysiłku fizycznego wartość ta może wzrosnąć nawet 10 razy (HALLIWELL 1994).

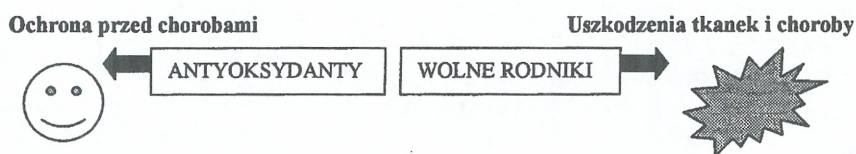
Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych znajdują się liczne me-

chanizmy chroniące komórkę przed toksycznym działaniem tlenu (BARTOSZ 1995, OLIŃSKI i JURGOWIAK 1996). Często dochodzi jednak do zaburzenia równowagi między tworzeniem RFT i działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego (Ryc. 1), co określane jest jako „stan szoku tlenowego”. W wyniku szoku tlenowego może dojść do uszkodzenia biomolekuł wchodzących w skład komórki, co z kolei prowadzi do rozwoju licznych stanów patologicznych. Najgroźniejsze implikacje dla organizmów wielokomórkowych niosą ze sobą reakcje WRT (zwłaszcza rodnika $\cdot\text{OH}$) z DNA. Takie interakcje prowadzić mogą do utworzenia pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA, wiązań poprzecznych i modyfikacji zasad azotowych. Opisano dotychczas ponad 20 różnego rodzaju oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych (OLIŃSKI

1993, ZASTAWNY 1997, DIZDAROGLU 1998), ale zaledwie w kilku przypadkach poznano biologiczne konsekwencje ich obecności w DNA.

Oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych można podzielić na dwie grupy biorąc pod uwagę ich biologiczne właściwości: a/ potencjalnie mutagenne oraz b/ blokujące proces replikacji DNA.

Typowym przykładem oksydacyjnego uszkodzenia DNA prowadzącego do bloku replikacyjnego jest glikol tyminy. Prawdopodobnie również obecność w cząsteczce DNA produktów częściowego rozpadu pierścienia purynowego, to znaczy — FapyA i FapyG, może prowadzić do zahamowania procesu replikacji (WALLACE 1994). Oksydacyjne modyfikacje zasad o znaczeniu mutagennym omówiono w dalszej części artykułu.



Ryc. 1. Zaburzenie równowagi pomiędzy formowaniem WRT a działaniem komórkowego systemu antyoksydacyjnego prowadzi do szoku tlenowego skutkującego uszkodzeniem tkanek w przebiegu wielu chorób człowieka.

ENDOGENNY POZIOM OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ DNA

Pewna „pula” oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych jest obecna w każdej komórce. Jest ona wyrazem równowagi istniejącej między powstawaniem w przebiegu wielu procesów metabolicznych RFT (patrz Tabela 1) atakujących DNA i usuwaniem uszkodzeń tej biomolekuły przez swoiste enzymy reperujące DNA. Problemy metodologiczne nie pozwalają na udzielenie precyzyjnej odpowiedzi na szereg istotnych pytań. W dalszym ciągu nie wiadomo jak wysoki jest endogenny poziom potencjalnie mutagennych uszkodzeń. Różne techniki analityczne dają wartości w zakresie od 0,2 do kilkuset modyfikacji/ 10^6 par zasad (COLLINS i współaut. 1997). Wydaje się jednak, że poziom ten wykazuje znaczne zróżnicowanie międzypersoniczne (COLLINS i współaut. 1998a). Skąpe jeszcze dane literaturowe pozwalają przypuszczać, że:

1) istnieje liniowa zależność zawartości 8-oksodG od wieku (JURGOWIAK i OLIŃSKI 1999),

2) poziom 8-oksodG jest niższy u kobiet niż u mężczyzn (COLLINS i współaut. 1998a),

3) poziom oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych zależy od aktywności enzymów antyoksydacyjnych (JARUGA i współaut. 1994),

4) zawartość 8-oksodG może być odwrotnie skorelowana z poziomem niektórych witamin o działaniu antyoksydacyjnym (A i C) (DUTHIE i współaut. 1996).

Ostatnia informacja (punkt 4) wymaga kilku zdań komentarza. Wyniki badań opublikowanych w *Nature* (PODMORE i współaut. 1998) sugerują jednak, że analiza zawartości jednej tylko zmodyfikowanej zasady (najczęściej jest to 8-oksodG) może doprowadzić do błędnej konkluzji. Z cytowanych powyżej badań wynika bowiem, że podanie pacjentom witaminy C doprowadza wprawdzie do statystycznie znaczącego spadku zawartości 8-oksodG, ale i do równo-

czesnego wzrostu poziomu 8-OHA. Witamina C może mieć działanie zarówno pro-, jak i antyoksydacyjne, co więcej podawana razem z żelazem wpływa na znaczący wzrost zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych (REHMAN i współaut. 1998). Warto w tym kontekście wspomnieć, że bardzo wiele odżywek popularnych w różnych krajach (w tym w Polsce) zawiera duże dawki zarówno witaminy C, jak i związków żelaza. Rezultaty niektórych badań podważają znaczenie podawania witamin o znaczeniu antyoksydacyjnym w redukcji oksydacyjnych uszkodzeń DNA (COLLINS i współaut. 1998b). Stwierdzono ujemną korelację między endogennym (pochodzącym z pożywienia) poziomem wi-

taminy A, a zawartością oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad pirymidynowych, przy braku takiej korelacji w przypadku witamin suplementowanych. Pozostaje to w zgodzie z sugestią, że znaczenie fizjologiczne ma obecny w diecie kompleks karotenoidów i fitynianów. Warto dodać, iż badania epidemiologiczne wykazały, że wysokie dawki witaminy A mogą działać prokancerogennie (PAOLINI i współaut. 1999).

W pracy DUTHIE i współaut. (1996) nie stwierdzono korelacji między stężeniem witamin o znaczeniu antyoksydacyjnym (A, C i E) a zawartością 8-oksoG.

MUTAGENNE WŁAŚCIWOŚCI OKSYDACYJNIE ZMODYFIKOWANYCH ZASAD AZOTOWYCH

Najlepiej poznaną modyfikacją DNA o właściwościach mutagennych jest 8-oksoG. W cząsteczce DNA 8-oksoG może występować w dwóch formach: *anty* i *syn*. W formie *syn* 8-oksoG może tworzyć stabilne pary zasad z adeniną (prawdopodobnie także z guaniną) (WANG i współaut. 1998) (Ryc. 2). Jeżeli w procesie replikacji DNA naprzeciwko 8-oksoG włączona zostanie adenina, to po dwóch rundach replikacyjnych pojawi się transwersja G → T. Z wolnymi rodnikami reagują nie tylko zasady wchodzące w skład DNA, ale również obecne w trójfosfodeoksynukleotydach. 8-oksodGTP jest dobrym substratem dla polimeraz DNA, a możliwość błędnego parowania zmodyfikowanej

oksydacyjnie guaniny może prowadzić do jej inkorporacji naprzeciwko adeniny i do substytucji A → C po trzech rundach replikacyjnych.

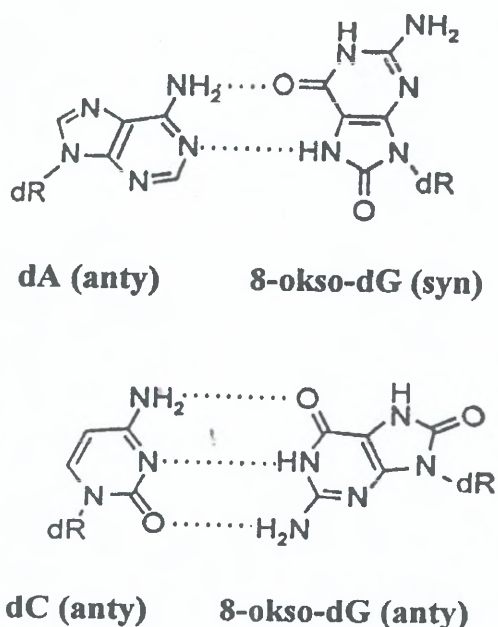
Nieco więcej kontrowersji dotyczy mutagennych właściwości 8-oksoA. Jej obecność w cząsteczce DNA może prowadzić do substytucji A → C i A → G, ale tylko w komórkach eukariotycznych. Polimerazy bakteryjne naprzeciwko 8-oksoA wbudowują T.

Inna modyfikacja adeniny, jaką jest 2-OHA, może tworzyć pary zasad z każdą zasadą wchodzącą w skład DNA. W związku z tym spektrum mutacji, które mogą powstać przy udziale tej zasady jest znacznie szersze niż omawianych powyżej. 2-OHA obecna w DNA i włączana przez polimerazy do cząsteczki DNA może prowadzić do transwersji A → T i A → C oraz tranzycji A → G i C → T. Równie szerokie spektrum mutacji obejmujące transwersję C → T i tranzycję C → G związane jest z obecnością 5-OHC (WANG i współaut. 1998).

Wprawdzie 5-OHU i glikol cytozyny są odpowiedzialne wyłącznie za indukowanie tranzycji C → T, ale częstość mutacji jakie są wynikiem obecności tych modyfikacji jest niezwykle wysoka i wynosi około 80%. Dla porównania częstość mutacji indukowanych obecnością 8-oksoG wyliczono na około 1% (WANG i współaut. 1998).

Tak jak wspomniano powyżej glikol tyminy stanowi silny blok replikacyjny. W określonym kontekście zasad 5'-C(Tg)C-3' i 5'-C(Tg)A-3' również ta modyfikacja może prowadzić do tranzycji T → C z częstością 0,3–0,4% (WANG i współaut. 1998).

Ponieważ wachlarz substytucji opisanych powyżej jest niemal identyczny ze spektrum najczęściej obserwowanych mutacji spontanicznych (WANG i współaut. 1998) można przypu-



Ryc. 2. Różne parowanie zasad w obecności 8-oksodG (według WANGA i współaut. 1998).

szczać, że indukowane wolnymi rodnikami modyfikacje zasad azotowych stanowią główną przyczynę mutacji endogennych.

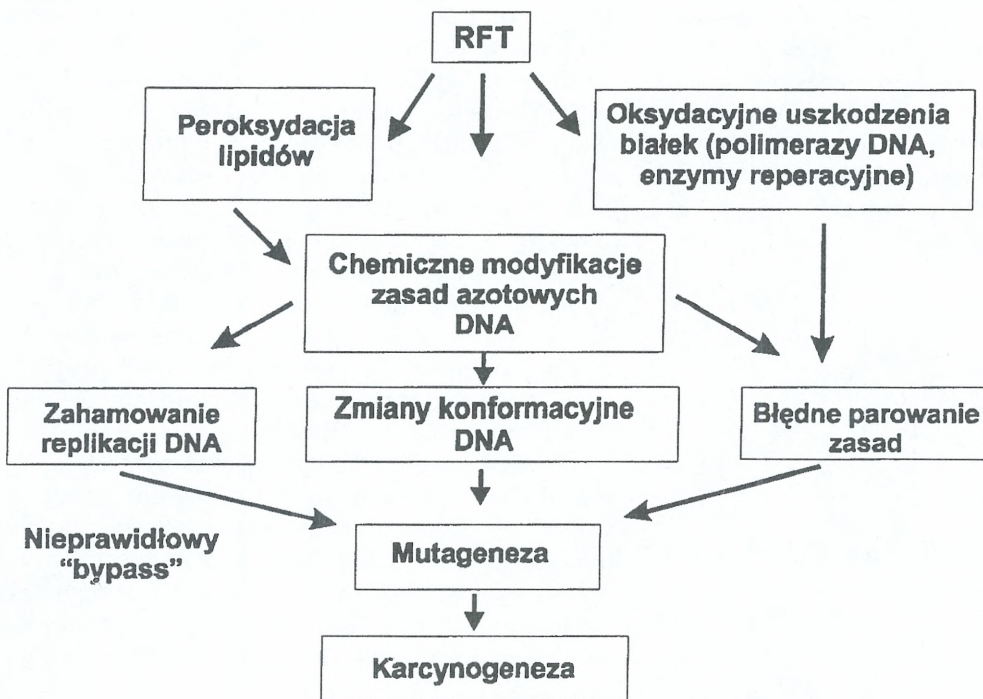
Kilka lat temu liczbę oksydacyjnych uszkodzeń DNA, wynikających z generowania wolnych rodników w procesach endogennych, szacowano na około 100 tysięcy/komórkę u szczura. Obecnie weryfikuje się tę wielkość w dół o około rząd wielkości (HELBOCK i współaut. 1998). Analizując zawartość 8-oksoG w moczu LOFT i współaut. (1993) doszli do wniosku, że w pojedynczej komórce człowieka może powstać kilkaset takich modyfikacji w przeciągu doby. Według innych danych 8-oksoG wytwarzana jest w ilości 178 cząsteczek na komórkę każdego

dnia (SHIGENAGA i współaut. 1989). Pamiętajmy o tym, że taka modyfikacja guaniny jest jedną z bardzo wielu możliwych zmian mutagennych indukowanych wolnymi rodnikami tlenowymi. Zdecydowana większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA musi więc być usytuowana w nieaktywnej (nie podlegającej ekspresji) części genomu, w przeciwnym razie przeżycie organizmu nie byłoby możliwe. Niewielka ilość tych promutagennych uszkodzeń może być umiejscowiona w genach supresorowych i onkogenach, co może zapoczątkować transformację nowotworową i niekontrolowaną proliferację komórki zawierającej takie mutacje.

REAKTYWNE FORMY TLENU A NOWOTWORY

RFT mogą mieć wpływ na każdy etap złożonego procesu karcynogenezy (LOFT i POULSEN 1996). Jak wykazano powyżej, WRT mogą uszkadzać DNA, co w konsekwencji może prowadzić do mutacji (Ryc. 3). Jeżeli taka mutacja

to się, że stres oksydacyjny indukowany działaniem $H_2O_2/FeCl_3$ na ludzkie fibroblasty jest odpowiedzialny za transwersje $G \rightarrow C$ w drugiej pozycji i tranzykcje $G \rightarrow A$ w pozycji trzeciej. Nie wyjaśniono jaka modyfikacja G prowadzi do



Ryc. 3. RFT oddziałują na biomolekuły komórkowe, w tym DNA co skutkuje zmianami mutagennymi.

wystąpi w genach supresorowych lub/i w onkogenach może to doprowadzić do inicjacji lub progresji procesu karcynogenezy. Dane eksperymentalne potwierdzają, że rodniki tlenowe indukują mutację w „gorących miejscach” anty-onkogenu *p53*. Kodon 248 tego genu (CGG) jest miejscem, które najczęściej ulega mutacjom w przypadku kilku ludzkich nowotworów. Okaza-

tych zmian. Natomiast spektrum mutacji w kodonach 249 (AGG) i 250 (CCC) zdominowane jest transwersjami $G \rightarrow T$ i $C \rightarrow G$, zmianami typowymi dla obecności 8-oksoG i 5-OHC.

W przypadku onkogeny *ras* jednym z kodonów, najczęściej ulegającym mutacjom, jest kodon 12 (GGC), w którym guanina ulega transwersji do tyminy. Włączenie do wektora plazmi-

dowego części onkogeny zawierającej, w miejscu G1 lub G2 kodonu 12, 8-oksoG prowadziło do transwersji G → T.

W zgodzie z powyższymi obserwacjami pozostaje fakt, że transwersje GC → TA, typowe dla błędnego parowania 8-oksodG, są bardzo często przyczyną mutacji antyonkogeny *p53* komórek raka płuc i protoonkogeny *ras* w przypadku raka wątroby człowieka. Należy też podkreślić, że ten sam typ zmian jest typowy dla adduktów DNA z benzopirenem i aflatoksyną B1 (OLIŃSKI i JURGOWIAK 1999).

RFT mogą mieć bezpośredni wpływ na przekazywanie sygnałów komórkowych i wzrost komórek (PENNISI 1997). Możliwe, że RFT działając jako aktywatory procesu transkrypcji (czynniki transkrypcyjne mogą być aktywowane pod wpływem szoku tlenowego) wpływają również na regulację cyklu komórkowego (JURGOWIAK i współaut. 1996).

Wyniki badań epidemiologicznych jednoznacznie wskazują, że dieta bogata w antyoksydanty (powiązana z wyższym poziomem tych czynników w surowicy krwi), wpływa na redukcję ryzyka zachorowania na nowotwory (DOLL i PETO 1981). Ciekawe jest, że w osoczu krwi osób palących nałogowo tytoń jest znacznie obniżony poziom antyoksydantów (DORGAN i SCHATZKIN 1991).

Jednym z najlepiej poznanych czynników karcynogennych jest dym papierosowy. Dym papierosowy zawiera ponad 3800 składników, w tym potencjalnie karcynogennych, jak benzo[*a*]piren oraz nasilających formowanie rodników tlenowych, jak na przykład hydrochinony. Te organiczne rodniki i toksyczne związki powodują powstawanie uszkodzeń DNA, białek i lipi-

dów (LEE i współaut. 1999). Obecnie wiadomo, że u zwierząt eksponowanych na działanie dymu tytoniowego następuje generowanie RFT w mitochondriach (GVOZDJAKOVA i współaut. 1992). Jak wynika z badań LOFTA i współaut. (1994) u kobiet palących tytoń poziom wydalanej w moczu 8-OHdG jest wyższy w porównaniu do kobiet nie palących. Tempo powstawania oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest zatem wyższe u osób używających tytoń. Potwierdzają to także badania LEE i współaut. (1999) w których wykazano, że delecje mtDNA (4977-pz), jak i oksydacyjne uszkodzenia DNA oraz peroksydacja lipidów są powiązane ze starzeniem i nasilone są w tkankach płuc osób palących. Dym tytoniowy zawiera dużą ilość oksydantów i indukuje uszkodzenia DNA także *in vitro* (LEANDERSON i TAGESSON 1992).

Na niebagatelną rolę jaką mogą pełnić oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe w procesie karcynogenezy wskazują wyniki badań, w których wykazano znacznie podwyższony poziom 8-oksodG w tkankach nowotworowych, w porównaniu do odpowiadających im tkanek prawidłowych. W tkance płucnej uzyskanej od palaczy stwierdzono najwyższe wartości 8-oksodG (OLIŃSKI i współaut. 1992). Wykazano także dodatnią korelację między poziomem 8-oksodG u palaczy, a jej poziomem u osób niepalących oraz zależność ilości 8-oksodG od liczby wypalanych papierosów w ciągu jednego dnia (ASAME i współaut. 1997). Również w nowotworach żołądka, jajników i mózgu wykazano istotne zmiany zawartości 8-oksodG w porównaniu z odpowiadającymi im obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych (OLIŃSKI i współaut. 1992).

MIAŻDŻYCA

Nieco uboższa jest dokumentacja dotycząca udziału RFT w patogenezie miażdżycy, chociaż i w tym wypadku nie brakuje danych literaturowych wskazujących na szok tlenowy jako jeden z czynników sprawczych tej patologii. Jedną z wczesnych zmian przedmiażdżycowych w ścianach naczyń jest akumulacja lipidów (m.in. w postaci zmodyfikowanej przez RFT frakcji LDL) przez makrofagi, w wyniku czego powstają komórki piankowe (KEHRER 1993, ROSS 1993).

W tym kontekście niezwykle intrygujące są hipotezy wskazujące na podobne molekularne podstawy rozwoju nowotworów i miażdżycy. Tym wspólnym mianownikiem mogą być mutacje. Od dawna wiadomo, że zmiany prowadzące do transformacji nowotworowej mają charakter

mutacji. Kilkanaście lat temu wysunięto hipotezę zakładającą, że również miażdżycy może rozwijać się na tle zmian indukowanych uszkodzeniami DNA, które utrwalone zostają w postaci mutacji. Zmiany te przypominają rozwój guza łagodnego (DE FLORA i współaut. 1997, ROSS 1993). Ostatnio pojawiły się, skąpe jeszcze, dane eksperymentalne potwierdzające słuszność tej hipotezy (DE FLORA i współaut. 1997). Jak wynika z danych opublikowanych w 1997 roku, jednym z czynników mutagennych prowadzących do rozwoju płytek miażdżycowych może być 8-oxodG (DE FLORA i współaut. 1997). W DNA izolowanym ze śródbłonna naczyń krwionośnych pobranych od chorych cierpiących na miażdżycę ilość 8-oksoG była niezwykle wysoka. Stwierdzono również dodatnią korela-

cje między zawartością tej zmodyfikowanej zasady a typowymi dla miażdżycy czynnikami ryzyka.

Wyniki badań opisane w innym artykule (COLLINS i współaut. 1998a) wskazują, że ryzyko zgonów na choroby serca, odmienne w różnych krajach Europy, koreluje z zawartością 8-oksoG

w DNA limfocytów (wartość korelacji pomiędzy ilością 8-oksoG i tzw. współczynnikiem CHD — ang. coronary heart disease — wynosi 0,9). Wyniki te sugerują, że zawartość oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych może być dobrym biomarkerem nie tylko chorób nowotworowych, ale i miażdżycy oraz chorób serca.

CUKRZYCA

U chorych na cukrzycę stwierdza się podwyższoną ilość anionorodnika ponadtlenkowego oraz podwyższoną zawartość dialdehydu malonowego (markera peroksydacji lipidów) w surowicy krwi (BARTOSZ 1995). Uważa się, że stres oksydacyjny związany z cukrzycą jest odpowiedzialny za powikłania miażdżycowe, które są najczęstszą przyczyną śmierci cukrzyków. Okazuje się, że w DNA izolowanym z limfocytów tej

grupy pacjentów obserwowano podwyższoną zawartość 8-oksoG oraz innych oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad (COLLINS i współaut. 1998c). Poziom takich modyfikacji był dodatnio skorelowany z zawartością glukozy we krwi pacjentów.

Wyższy poziom 8-oksoG stwierdzono również w moczu pacjentów chorych na cukrzycę (LEINONEN i współaut. 1997).

CHOROBY NEURODEGENERACYJNE (DYSFUNKCJE MÓZGU)

W przeprowadzonych badaniach biochemicznych wykazano, że RFT mogą być przyczyną patologii dotyczących mózgu. Z kolei podczas badań epidemiologicznych zwrócono uwagę na ochronne efekty działania spożywanych owoców, warzyw, bądź przeciwutleniaczy w zapobieganiu nasilenia „szoku tlenowego” w takich schorzeniach, jak: choroba Parkinsona, choroba Alzheimera i rodzinny wariant stwardnienia zanikowego bocznego (choroba Lou Gehriga). U pacjentów cierpiących na wymienione jednostki chorobowe obserwuje się podwyższoną zawartość 8-oksoG (SPENCER i współaut. 1994). Obecność znacznych ilości tej zmodyfikowanej zasady w neuronach osób chorych na choroby neurodegeneracyjne mogą wyjaśniać wyniki eksperymentów opublikowane przez cytowanych powyżej autorów. Autorzy ci zaobserwowali, że L-DOPA i jej metabolity są odpowiedzialne za generowanie znacznej ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA w obecności H₂O₂ i jonów miedzi (lub jonów żelaza). W neuronach stężenie L-DOPA jest wysokie. Intensywny metabolizm tlenowy może być odpowiedzialny za wytwarzanie sporych ilości nadtlenu wodoru,

a w wyniku uszkodzenia tkanki mózgowej (co jest charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych) może dojść do uwolnienia jonów miedzi czy też jonów żelaza. U osobników cierpiących na chorobę Parkinsona poziom uszkodzeń DNA powstających na skutek działania RFT jest podwyższony w rejonach mózgu obfitujących w neurony dopaminergiczne (SANCHEZ-RAMOS i współaut. 1994).

W niedawno opublikowanych wynikach badań wskazuje się na rolę wolnorodnikowych uszkodzeń DNA w patogenezie choroby Alzheimera (LOVELL i współaut. 1999, MARKESBERY i CARNEY 1999). U pacjentów z chorobą Alzheimera wzrasta poziom markerów peroksydacji lipidów, jak i oksydacyjnych uszkodzeń DNA. W tym drugim przypadku analizowano poziom 8-OHdG. Mózg osób cierpiących na chorobę Alzheimera podlega działaniu nasilonego stresu oksydacyjnego. Zaburzone zostają również mechanizmy naprawy DNA. Markery stresu oksydacyjnego są identyfikowane w mózgu pacjentów i pochodzą zarówno z jądrowego, jak i mtDNA (LOVELL i współaut. 1999).

CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE

W moczu pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykryto znacznie podwyższoną zawartość 8-oksoG (MCCALL i FREI 1999). Przypuszcza się natomiast, że w komórkach pacjentów cierpiących na liszaj rumieniowaty (*lupus erythematosus*) zdolność usuwania

oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest znacznie upośledzona. Pacjenci z liszajem rumieniowatym nie wydalają wraz z moczem 8-oksoG (LUNEC i współaut. 1994). Badania monocytów w hodowli wykazały obniżenie u chorych na liszaj rumieniowaty zdolności naprawczych

8-oksodG indukowanej przez inkubację komórek w nadtlenu wodoru. Limfocyty izolowane od pacjentów z powyższymi schorzeniami charakteryzują się wzrostem poziomu 8-oksodG w DNA (LOFT i POULSEN 1996). Dane te wskazują

na rolę WRT w patogenezie chorób autoimmunologicznych oraz wyjaśniają zwiększone ryzyko zapadania na choroby nowotworowe u takich pacjentów.

NIEKTÓRE JEDNOSTKI CHOROBY POWIĄZANE SĄ Z ZABURZENIAMI W FUNKCJONOWANIU ENZYMÓW NAPRAWIAJĄCYCH OKSYDACYJNE USZKODZENIA DNA

Aktywność enzymów usuwających uszkodzenia DNA charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem międzyosobniczym (KYRTOPOULOS 1995). Na przykład, populacyjne różnice w aktywności glikozylazy uracylowej mogą dochodzić do 300 razy. Ponieważ zarówno wydajność, jak i dokładność procesów naprawy DNA jest bezpośrednio powiązana z częstością występowania mutacji, należy przypuszczać, że zjawiska te (naprawa DNA) będą również miały bezpośredni związek z procesem karcynogenezy.

W każdej komórce znajdują się enzymy, które mniej lub bardziej specyficznie rozpoznają i usuwają oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe. Różne mechanizmy reperujące takie uszkodzenia DNA najlepiej scharakteryzowano w komórkach bakteryjnych (ZASTAWNY 1996). Ostatnio opisano również homologi enzymów prokariotycznych funkcjonujące w komórkach człowieka na przykład ludzki homolog (funkcjonalny) genu *Fpg* — *hOGG1*, zlokalizowano w lokus 3p25 (RADICELLA i współaut. 1997). Ponieważ dosyć często obserwuje się utratę heterozygotyczności w tym regionie, w przypadku nowotworów nerki i płuc przypuszcza się, że gen ten może być genem supresorowym (CHEVILLARD i współaut. 1998). Nie ma wątpliwości, że *BRCA1* jest genem supresorowym. Od dawna przypuszczano, że jedną z funkcji białka *BRCA1* jest udział w procesie naprawy DNA. Okazuje się, że białko to bierze udział w usuwaniu glikolu tyminy, w procesie naprawy powiązanim z transkrypcją (ang. transcription coupled repair) (SANCAR 1995, GOWEN i współaut. 1998).

W przypadku nowotworów nerki i płuc człowieka stwierdzono podwyższoną ekspresję genów *hMTH1* — ludzkiego homologu bakteryjnego genu *mutT* hydrolizującego 8-oxodGTP. Co więcej, stopień ekspresji tego genu był proporcjonalny do stopnia zaawansowania choroby nowotworowej (KENNEDY i współaut. 1998). Wskazuje to na nasilenie szoku tlenowego w komórkach nowotworowych.

Defektywne mechanizmy usuwające oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe mogą mieć również wpływ na przebieg takich chorób, jak *Xeroderma pigmentosum* (XP), zespół Cockayne'a (CS), czy zespół Blooma. Zaproponowa-

no, że w przypadku XP z powikłaniami neurologicznymi w neuronach pacjentów, aktywność glikozylaz usuwających oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe jest niewystarczająca do usunięcia dużej ilości uszkodzeń DNA, powstających w wyniku nasilonego szoku tlenowego (REARDON i współaut. 1997). Neurony zużywają bardzo duże ilości tlenu cząsteczkowego, w związku z czym produkcja RFT może być w tych komórkach podwyższona. W takim wypadku znaczącą rolę w usuwaniu oksydacyjnych uszkodzeń zasad azotowych DNA może odgrywać system reperacji przez wycinanie, który w przypadku komórek XP jest niesprawny (REARDON i współaut. 1997). Prowadzić to może do obumierania neuronów i objawów choroby neurologicznej.

W przypadku pacjentów cierpiących na CS (także pacjentów cierpiących na XP grupa G) upośledzony jest mechanizm naprawy połączonej z procesem transkrypcji, który jest odpowiedzialny za usuwanie między innymi glikolu tyminy (Van GOOL i współaut. 1997). U pacjentów CS stwierdza się także upośledzoną naprawę 8-oksoguaniny w DNA. Niski poziom glikozylazy usuwającej 8-oksoguaninę z DNA w materiale biologicznym pacjentów z CS koreluje z obniżoną ekspresją genu kodującego glikozylazę (gen *hOGG1*) w którym stwierdzono mutacje (DIANOV i współaut. 1999).

ANEMIA FANKONIEGO (FA)

Anemia Fankoniego to choroba dziedziczna w sposób autosomalny recesywny. Charakteryzuje się chromosomową niestabilnością oraz wrażliwością komórek na tlen i wzrostem ryzyka zapadalności na choroby nowotworowe, co sugeruje związek tej choroby z oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA (LOFT i POULSEN 1996). Lokalizacja genu *hOGG1* na chromosomie 3p25 otwiera interesującą możliwość, że uszkodzenie tego genu może być jednym z czynników decydujących o cechach fenotypowych komórek FA. W tej jednostce chorobowej obserwuje się delecje w tym właśnie fragmencie chromosomu 3 (RADICELLA i współaut. 1997). Obecnie przypuszcza się, że duża wrażliwość komórek na mito-

mocną C wynika raczej z możliwości generowania wolnych rodników tlenowych przez ten mutagen, a nie jak wcześniej przypuszczano, z jego zdolności indukowania wiązań poprzecznych (LACKINGER i współaut. 1998). Co więcej w limfoblastach pacjentów cierpiących na FA zaobserwowano znacznie podwyższony poziom 8-oksoG (MCCALL i FREI 1999). Oksydacyjne uszkodzenia i zaburzona naprawa DNA to przy-

czyny podwyższonego poziomu 8-oksoguaniny i niestabilności chromosomów charakterystycznych dla komórek FA (LACKINGER i współaut. 1998). Limfoblasty pacjentów z FA wykazują podwyższony poziom indukowanej 8-oksodG przez inkubację w nadtlenu wodoru, co prawdopodobnie związane może być ze znacznym obniżeniem aktywności katalazy (LOFT i POULSEN 1996).

ZAKOŃCZENIE

Najbardziej intrygujące pytanie, na które należałoby odpowiedzieć w zakończeniu brzmi: czy oksydacyjne uszkodzenia DNA są przyczyną opisanych jednostek chorobowych, czy raczej ich obecność jest skutkiem toczących się procesów chorobowych? Wydaje się, że w większości omówionych przypadków uszkodzenia DNA pojawiają się w wyniku stresu oksydacyjnego, który jest skutkiem toczącego się procesu chorobowego. Tak jest w przypadku jednostek chorobowych, którym towarzyszą stany zapalne oraz w cukrzycy. Skomplikowany natomiast jest wkład wolnorodnikowych uszkodzeń DNA w proces transformacji nowotworowej komórki. Od lat wiadomo, że karcynogeneza jest procesem wieloetapowym (SIEDLECKI 1995, FRANKS i TEICH 1997). Zgodnie z opinią, że nowotwór powstaje w wyniku nagromadzenia się zmian materiału genetycznego można założyć, że reprezentują one sukcesywnie następujące po sobie mutacje. Nie ma wątpliwości, że niektóre z omawianych powyżej modyfikacji zasad azotowych mogą za takie mutacje odpowiadać. Wiele typowych czynników karcynogennych generuje wolne rodniki tlenowe, co najczęściej prowadzi do podwyższenia zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA. Jak wspomniano wcześniej w każdej aerobowej komórce wystę-

puje pewna ilość endogennie generowanych oksydacyjnych zmian DNA. Dane te upoważniają do stwierdzenia, że wolne rodniki tlenowe mogą być jednym z uniwersalnych czynników decydujących o procesie transformacji nowotworowej komórki. Obecność 8-oksoG może również przyczyniać się do zmniejszenia stopnia metylacji genomu, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej ekspresji genów i indukcji procesu transformacji nowotworowej. Nie wiadomo dlaczego chorobom neurodegeneracyjnym towarzyszy podwyższony poziom oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych. Jednak nawet w tych przypadkach gdzie są one skutkiem procesów chorobowych mogą one być użytecznym biomarkerem stanów patologicznych.

Trudności metodologiczne dotyczące badań wolnorodnikowych uszkodzeń biomolekuł nie pozwalają udzielić jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o związku przyczynowo skutkowym między konkretną jednostką chorobową a występowaniem oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych. Obecność enzymów specyficznymi usuwających takie uszkodzenia również w tkankach postmitotycznych i to w regionach genomu transkrypcyjnie aktywnych sygnalizuje niezwykłą wagę problemu.

OXIDATIVE DNA DAMAGE (8-oxodG) — BIOMARKER OF SOME DISEASES IN MAN

Summary

In living cells reactive oxygen species (ROS) are formed as a consequence of the cell metabolism as well as they can get into the cell from external sources. Oxidative damage to DNA is an important factor in some human diseases. The modified nucleosides accumulate with age in both nuclear and mitochondrial DNA. These lesions, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) is the most mutagenic. If un-

repaired, these lesion can exert a number of deleterious effects including the induction of mutations. Oxidative DNA damage has been implicated in mutagenesis, carcinogenesis and other human diseases such as neurodegenerative diseases, arterosclerosis, diabetes, autoimmune diseases, and in aging.

LITERATURA

- ASAMI S., MANABE H., MIYAKE J., TSURUDOME Y., HIRANO T., YAMAGUCHI R., ITOCH H., KASAI H., 1997. *Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine in a central site of the human lung*. Carcinogenesis 18, 1763-1766.
- BARTOSZ G., 1995. *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- CHEVILLARD S., RADICELLA J. P., LEVALOIS C., LEBELAU J., POUPON M-F., OUDARD S., DUTRILLAUX B., BOITEUX S., 1998. *Mutations in OGG1, a gene involved in the repair*

- of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16, 3083–3086.
- COLLINS A. R., CADET J., EPE B., GEDIK C., 1997. Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January. *Carcinogenesis* 18, 1833–1836.
- COLLINS A. R., GEDIK C. M., OLMEDILLA B., SOUTHON S., BELLIZZI M., 1998a. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 12, 1397–1400.
- COLLINS, A. R., OLMEDILLA, B., SOUTHON, S., GRANADO, F., DUTHIE, S. J., 1998b. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19, 2159–2162.
- COLLINS, A. R., RASLOVA, K., SOMOROVSKA, M., 1998c. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 373–377.
- DE FLORA S., IZZOTTI A., WALSH D., DEGAN P., PETRILLI G. L., LEWTAS J., 1997. Molecular epidemiology of atherosclerosis. *FASEB J.* 11, 1021–1031.
- DIANOV G., BISCHOFF C., SUNESEN M., BOHR V. A., 1999. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucl. Acid Res.* 27, 1365–1368.
- DIZDAROGLU M., 1998. Mechanisms of free radical damage to DNA. [W:] *DNA and free radicals: Techniques, mechanisms and applications* ARUOMA O. I., HALLIWELL B., (red.), OICA Int. Saint Lucia, London, str. 3–26.
- DOLL R., PETO R., 1981. *The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today.* Oxford University Press, Oxford.
- DORGAN J. F., SCHATZKIN A., 1991. Antioxidant micronutrients in cancer prevention. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 5, 43–68.
- DUTHIE S. J., MA A., ROSS M. A., COLLINS A. R., 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 56, 1291–1295.
- FRANKS L. M., TEICH N. M. 1997. *Cellular and molecular biology of cancer.* Oxford University Press 5.
- GOWEN L. C., AVRUTSKAYA A. V., LATOUR A. M., KOLLR B. H., LEADON S. A., 1998. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 281, 1009–1012.
- GVOZDZAKOVA A., KUCHARSKA J., GVOZDZAK J., 1992. Effect of smoking on the oxidative processes of cardiomyocytes. *Cardiology* 81, 81–84.
- HALLIWELL B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 52, 253–265.
- HELBOCK H. J., BECKMAN K. B., SHIGENAGA M. K., 1998. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 288–293.
- JARUGA P., ZASTAWNY T. H., SKOKOWSKI J., DIZDAROGLU M., OLIŃSKI R., 1994. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.* 341, 59–64.
- JURGOVIAK M., OLIŃSKI R., 1999. Uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego DNA w procesach starzenia. *Kosmos* 48, 1–10.
- JURGOVIAK M., BIAŁKOWSKI K., OLIŃSKI R., 1996. Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów. *Post. Biochem.* 42, 6–13.
- KEHRER J. P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 21–48.
- KENNEDY CH. H., CUETO R., BELINSKY S. A., LECHNER J. F., PRYOR W. A., 1998. Overexpression of hMTH1 mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. *FEBS Letters* 429, 17–20.
- KYRTOPOULOS S. A., 1995. Variability in DNA repair and individual susceptibility to genotoxins. *Clin. Chem.* 41/12, 1848–1853.
- LACKINGER D., RUPPITSCH W., RAMIREZ M. H., HIRSCHKAUFFMANN M., SCHWEIGER M., 1998. Involvement of the Fanconi anemia protein FA-C in repair processes of oxidative DNA damages. *FEBS Letters* 440, 103–106.
- LEANDERSON P., TAGESSON C., 1992. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem. Biol. Interact.* 810, 197–208.
- LEE H., LIM M. L. R., LU CH., LIU V. W. S., FAHN H., ZHANG CH., NAGLEY P., WEI Y., 1999. Concurrent Increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging – smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 362 309–316.
- LEINONEN J., LEHTIMAKI, T., TOYOKUNI, S. 1997. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 417:150–152.
- LOFT S., POULSEN H. E., 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74, 297–312.
- LOFT S., FISHER-NIELSEN A., JEDING I. B., VISTISEN K., POULSEN H., 1993. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 391–404.
- LOFT S., ASTRUP A., BUEMANN B., POULSEN H. E., 1994. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* 8, 534–537.
- LOVELL M. A., GABBITA S. P., MARKESBERY W. R., 1999. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimers disease ventricular CSF. *J. Neurochem.* 72, 771–776.
- LUNEC J., HERBERT K., BLOUNT S., GRIFFITHS H. R., EMERY P., 1994. 8-hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett.* 348, 131–138.
- MCCALL M. R., FREI B., 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical. Biology. and. Medicine* 26, 1034–1053.
- MARKESBERY W. R., CARNEY J. M., 1999. Oxidative alterations in Alzheimers disease. *Brain Pathology* 9, 133–146.
- OLIŃSKI R., 1993. Uszkodzenia DNA indukowane działaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 47, 463–474.
- OLIŃSKI R., JURGOVIAK M., 1996. Reaktywne formy tlenu – uniwersalny czynnik patogeny? [W:] *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie.* BARCISZEWSKI J., ŁASTOWSKI K., TWARDOWSKI T., (red.) Wydawnictwo Sorus. Poznań str. 373–400.
- OLIŃSKI R., JURGOVIAK M., 1999. Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenezy i karcynogenezy. *Post. Biochem.* 45, 50–58.
- OLIŃSKI R., ZASTAWNY T. H., BUDZBON J., SKOKOWSKI J., ZEGARSKI W., DIZDAROGLU M., 1992. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* 309, 193–198.
- PAOLINI M., CANTELLI-FORTI G., PEROCO P., PEDULLI G. F., ABDEL-RAHMAN S. Z., LEGATOR M. S., 1999. Co-carcinogenic effect of -carotene. *Nature.* 398, 760–761.
- PENNISI E., 1997. Superoxides relay Ras proteins oncogenic message (news, comment). *Science.* 275, 1567–1568.
- PODMORE I. D., GRIFFITHS H. R., HERBERT K. E., MISTRY N., MISTRY P., LUNEC, J., 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties [letter]. *Nature* 392–559.
- RADICELLA J. P., DHERIN C., DESMAZE CH., FOX M. S., BOITEUX S., 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 8010–8015.
- REARDON J. T., BESSHO T., KUNG H. CH., BOLTON P. H., SANCAR A., 1997. In vivo repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9463–9468.

- REHMAN A., COLLIS C. S., YANG M., 1998. *The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 293-298.
- ROSS R., 1993. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature. 362, 801-809.
- SANCAR A., 1995. *DNA repair in humans.* Annu. Rev. Genetics. 29, 69-105.
- SANCHEZ-RAMOS J. R., OVERVIK E., AMES B. N., 1994. *A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinsons disease brain.* Neurodegeneration 3, 197-204.
- SHIGENAGA M. K., GIMENO C. J., AMES B. N., 1989. *Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 9697-9701.
- SIEDLECKI J. A., 1995. *Molekularne podstawy chorób nowotworowych.* Kosmos 44, 311-321.
- SPENCER J. P., JENNER A., ARUOMA O. I., 1994. *Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease.* FEBS Lett. 353, 246-250.
- WANG D., KREUTZER D. A., ESSIGMANN J. M., 1998. *Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions.* Mutation Res. 400, 99-115.
- WALLACE S. S., 1994. *DNA damages processed by base excision repair: biological consequences.* Int. J. Radiat. Biol. 66, 579-589.
- VAN GOOL A. J., GIJSBERTUS T. J., van der HORST T. J., CITTERIO E., HOEIJMAKERS J. H. J., 1997. *Cockayne syndrome: defective repair of transcription? EMBO J.* 16, 4155-4162.
- ZASTAWNY T. H., 1996. *Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA u Prokaryota.* Post. Biochem. 42, 31-41.
- ZASTAWNY T. H., 1997. *Oksydacyjne uszkodzenia DNA - wolnorodnikowe modyfikacje zasad i deoksyrybozy.* Post. Biochem. 43, 238-250.