

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERLERİNDE OKSİDATİF DNA HASARI**

ÖZLEM ŞENOL

**BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDE OKSİDATİF DNA HASARI

BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM ŞENOL

Tez Danışmanı **PROF. DR. FATOŞ GÜLDAL KIRKALI**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2007.KB.SAG.067
nolu proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

Tesekkür	i
Tablo Listesi.....	ii
Şekil Listesi.....	iii
Ekler.....	v
Kısaltmalar.....	vi
Özet.....	viii
Abstract.....	ix
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	1
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	3
2.1. AKCİĞER KANSERİ	3
2.1.1 Akciğer kanserinin evrelemesi	3
2.1.2. Akciğer kanserinin sınıflandırılması	4
2.1.2.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserleri	6
2.1.3. Akciğer kanseri moleküler patolojisi	7
2.2. OKSİDATİF DNA HASARI	8
2.2.1. DNA baz hasarı	9
2.2.1.1. Hidroksil radikalinin pirimidinlerle yaptığı reaksiyonlar	10
2.2.1.2. Hidroksil radikalinin pürinlerle yaptığı reaksiyonlar	15
2.2.2. Şeker Hasarı	17

2.2.3. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler.....	19
2.2.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları.....	19
2.3. DNA TAMİR MEKANİZMALARI.....	20
2.3.1. Baz Keme-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair-BER).....	20
2.3.2. Nükleotid Kesme-çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair-NER).....	23
2.4. OKSİDATİF DNA HASARI VE TÜMÖR OLUŞUMU.....	24
2.4.1. ROT'a bağlı mutasyonlar	25
2.5. GAZ/SIVI KROMATOĞRAFI – KÜTLE SPEKTROMETRİ.....	26
3. <u>ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER</u>	34
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER.....	34
3.1.1. Kimyasal Maddeler	34
3.1.2. Cihazlar.....	35
3.2. OLGU SEÇİMİ VE MATERYAL ELDESİ.....	36
3.2.1. Materyal eldesi.....	36
3.2.2. Örneklerin toplanması ve saklanması	37
3.2.3. DNA izolasyonu	37
3.2.4. Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçüm Yöntemi.....	38
3.2.4.1. Örneklerin analize hazırlanması.....	38
3.2.4.2. DNA örneklerinin LC/MS ile analizi.....	40
3.2.5. Gaz Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçüm Yöntemi.....	41
3.2.5.1. Örneklerin analize hazırlanması.....	41
3.2.5.2. DNA örneklerinin GC/MS ile analizi.....	43
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	43
4. <u>SONUÇLAR</u>	45

4.1. ÇALIŞMA OLGULARININ ÖZELLİKLERİ.....	45
4.2 ÇALIŞMADA ANALİZİ YAPILAN LEZYONLAR VE BUNLARA İLİŞKİN BULGULAR.....	47
4.2.1. LC/MS ile tanımlanan lezyonlar	49
4.2.2 GC/MS ile tanımlanan lezyonlar.....	53
5. <u>TARTIŞMA VE SONUÇ</u>.....	60
5.1 TARTIŞMA.....	60
5.2. SONUÇ.....	66
6. <u>KAYNAKLAR</u>.....	67

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bana her konuda örnek olan, manevi desteğini esirgemeyen ve engin bilimsel tecrübesini benimle paylaşan başta danışmanım Sayın Prof. Dr. Güldal KIRKALI'ya; öğrencilerinin verimli bir yüksek lisans eğitimi görmesi için elinden geleni yapan ve her türlü kolaylığı sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürü Sayın Prof. Dr. Gül GÜNER'e; çalışmamız sırasında laboratuvarının tüm imkanlarını bizlerle paylaşan ve her zaman manevi desteğini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Miral DİZDAROĞLU'na; Biyokimya AD Bşk. Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a ve Biyokimya AD öğretim üyelerine; bilimsel ve manevi tüm desteğinden dolayı Sayın Doç. Dr. Halil RESMİ'ye, örneklerin toplanması ve DNA izolasyonu sırasındaki yardımlarını unutmayacağım dönem arkadaşım Ar. Gör. Ebru EZER TAYLAN'a, araştırmamın planlanmasında, örneklerin alınmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Can SEVİNÇ', Doç. Dr. Aydın ŞANLI, Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖNEN ve Barış YÜCEL'e; desteklerini hep gördüğüm tüm ARLAB çalışanlarına; ayrıca eğitimimdeki desteklerini unutmayacağım ve her zaman örnek alacağım Sayın Ferda ve Bumin GÜRSES'e, hayatımı her açıdan anlamlı kılan sevgili anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkür ederim.

Özlem Şenol

2009

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 TNM sınıflamasına göre evrelendirme.....	4
Tablo 2.2 TMN sınıflaması.....	5
Tablo 2.3 Akciğer tümörleri sınıflandırması.....	6
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	34
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar.....	35
Tablo 4.1 Çalışma olgularının yaş, sigara içme durumu ve sigara maruziyeti gibi özellikleri.....	45
Tablo 4.2 Çalışma olgularının tümör dokularının klinik ve patolojik evreleri...	46
Tablo 4.3 Çalışma olgularının tümör dokularının patoloji sonuçları.....	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin başlıca tipleri.....	8
Şekil 2.2 ·OH radikalının pirimidinlerle reaksiyonları.....	11
Şekil 2.3 Oksijen yokluğunda sitozinin C5-OH-eklenti radikalinden ürün oluşumu.....	12
Şekil 2.4 Timinin C5-, C6-OH-eklenti ve allil radikalının ürün oluşumu.....	13
Şekil 2.5 Oksijen varlığında sitozinin C5- ve C6-OH-eklenti radikallerinden ürün oluşumu.....	14
Şekil 2.6 OH· radikalının pürinlerle reaksiyonları.....	15
Şekil 2.7 Guaninin C4- ve C5-OH eklenti radikallerinin reaksiyonları.....	16
Şekil 2.8 Oksijen yokluğunda guaninin C8-OH-eklenti radikalinden ürün oluşumu.....	17
Şekil 2.9 Oksijen eksikliğinde şeker artığının C1'-radikalinden ürün oluşumu..	18
Şekil 2.10 Kromatinde timin-tirozin çapraz bağlanmalarının oluşumu.....	19
Şekil 2.11 Baz eksizyon tamir yolağının şematik diyagramı.....	22
Şekil 2.12 Tipik bir gaz kromatogramı.....	27
Şekil 2.13 Kütle spektrometri akış şeması.....	29
Şekil 2.14 4,6-diamino-5-formamidopirimidin'in trimetilsilil türevinin elektron çarpışma kütle spektrumu.....	30
Şekil 2.15 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin'in kütle spektrumu.....	31
Şekil 2.16 4,6-diamino-5-formamidoprimidin(Me_3Si) ₃ ve 4,6-diamino-5 formamidoprimidin- ¹⁵ N ₃ , ¹³ C, ² H (Me_3Si) ₃ 'in EI-kütle spektrumları.....	32
Şekil 2.17 DNA nükleozidlerinin LC/MS ile ayrılması ve tanımlanması.....	33

Şekil 2.18 Bileşik miktarı ile iyon-akım profilindeki sinyal alanı arasındaki ilişki.....	33
Şekil 3.1 DNA okside bazının trimetilsilayon ile derivatizasyonu.....	42
Şekil 4.1 Çalışmada analizi yapılan lezyonların kimyasal yapıları.....	48
Şekil 4.2 8'5-cdAdo'nun parçalanma yolları, LC/MS analizi sırasında elde edilen iyonların iyon-akım profilleri.....	49
Şekil 4.3 S-cdA'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği.....	50
Şekil 4.4 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol dokularında yaşa bağlı S-cdA/10 ⁶ DNA bazı oranları.....	51
Şekil 4.5 S-cdA/10 ⁶ DNA bazı oranlarının klinik ve patolojik evre açısından karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.6 FapydG'nin Me ₃ Si türevinin yapısı ve başlıca karakteristik iyonlarının parçalanma modeli, FapyGua ve FapyGua- ¹³ C, ¹⁵ N ₂ 'nin Me ₃ Si türevlerinin EI-kütle spektrumları.....	53
Şekil 4.7 FapyGua'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği.....	54
Şekil 4.8 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol ve tümör dokularında yaşa bağlı FapyGua/10 ⁶ DNA bazı oranları	55
Şekil 4.9 FapyGua/10 ⁶ DNA bazı oranlarının klinik ve patolojik evre açısından karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.10 8-OH-Gua'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği.....	57
Şekil 4.11 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol ve tümör dokularında yaşa bağlı 8-OH-Gua/10 ⁶ DNA bazı oranları.....	58
Şekil 4.12 8-OH-Gua/10 ⁶ DNA bazı oranlarının klinik ve patolojik evre açısından karşılaştırılması.....	59

EKLER

EK 1 Etik kurul raporu.....	86
------------------------------------	-----------

KISALTMALAR

- ROT:** Reaktif Oksijen Türleri
- DNA:** Deoksiribonükleik Asit
- KHOAK:** Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
- KHAK:** Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
- NSCLC:** Non-small Cell Lung Cancer
- \cdot OH:** Hidroksil Radikali
- $O_2^{\cdot-}$:** Süperoksit Radikali
- H_2O_2 :** Hidrojen peroksit
- S-cdA:** 5' (S)-8,5' siklo-2'-deoksiadenozin
- S-cdG:** 5' (S)-8,5' siklo-2'-deoksiguanozin
- 8-OH-Gua:** 8-hidroksiguanin
- 8-OH-Ade:** 8-hidroksiadenin
- FapyGua:** 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
- FapyAde:** 4,6-diamino-formamidopirimidin
- 8-OH-dG:** 8-hidroksideoksiguanozin
- 8-OH-dA:** 8-hidroksideoksiadenozin
- G:** Guanin
- T:** Timin
- A:** Adenin
- C:** Sitozin
- NEIL1:** Formamidoprimidin DNA glikozilaz
- Ogg1:** 8-OH-Guanin glikozilaz

Nth: Endonükleaz III

Fpg: Formamidoprimidin glikozilaz

GC/MS: Gaz kromatografi kütle spektrometri

LC/MS: Sıvı kromatografi kütle spektrometri

SIM: Selective ion monitoring

EI: Elektron Çarpışma İyonizasyonu

ESI: Elektronsprey İyonizasyonu

IDMS: İzotop Dilüsyonlu Kütle Spektrometri

BER: Base Excision Repair

NER: Nucleotide Excision Repair

AP: Apürinik/apirimidinik

BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid

ÖZET

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK), akciğer dokusu hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşur. Oluşumunda sigaranın yanı sıra çeşitli kimyasal karsinojenlerin de önemli rol aldığı bilinmektedir. Serbest radikalleri de içeren oksijenden köken alan türlerden kaynaklanan oksidatif DNA hasarı, DNA üzerinde baz ve şeker lezyonları, zincir kırılmaları, DNA-protein çapraz bağlanmaları ve abazik bölgeler gibi çok çeşitli değişikliklere yol açabilir. Oksidatif DNA hasarının mutasyonlara yol açarak kanser oluşumunda rol alabileceği düşünüldüğü için farklı kanser dokularından alınan DNA'da bu modifikasyonların ölçülmesi kanser oluşumunun mekanizmasının anlaşılması için elzemdir. Sunulan bu çalışmanın amacı küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda kontrol ve kanser doku DNA'larının oksidatif hasar açısından karşılaştırılması ve oksidatif DNA hasarının yaş, sigara maruziyeti ve evre ile ilişkisinin incelenmesidir.

Bu çalışmada, cerrahi rezeksiyon geçiren 29 KHOAK'li hastadan elde edilen tümör ve sağlıklı dokulardan izole edilen DNA örnekleri kullanıldı. Hasta dokular DNA baz ve nükleozid hasarı açısından incelendi ve kontrol dokuları ile karşılaştırıldı. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (S-cdA) tümör dokularında sağlıklı çevre dokuya göre artmış bulundu ($p=0.0063$). Diğer taraftan 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) düzeyleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Ayrıca bu hastalar arasında oksidatif DNA hasarı ile yaş, sigara maruziyeti, klinik veya patolojik evre arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı.

Sonuç olarak akciğer kanser dokularında DNA'da oksidatif hasarın çok çeşitli temel ürünlerinin birikimini ilk kez gösterdik. Gelecekteki çalışmalar, oksidatif DNA hasarından korunma, DNA tamir yetersizlikleri ve KHOAK hastalarında artmış olası DNA tamirine yoğunlaşmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri, Oksidatif DNA Hasarı, S-cdA, FapyGua, 8-OH-Gua

ABSTRACT

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is uncontrolled cell proliferation of lung tissue cells and known to be caused by smoking and exposure to various other chemical carcinogens. Oxidative DNA damage caused by oxygen-derived species including free radicals can produce a multiplicity of modifications in DNA such as base and sugar lesions, strand breaks, DNA-protein cross-links and abasic sites. Since this type of damage to DNA can be implicated in the carcinogenesis by causing mutations, the measurement of modifications in DNA from different cancer tissues is essential for understanding the mechanism of carcinogenesis. The aim of this study is to compare the control and cancer tissue DNAs in terms of the oxidative damage and to investigate the correlation between age, smoking, stage and oxidative DNA damage.

In this study, DNA samples isolated from tumor and healthy tissues obtained from 29 patients with NSCLC who underwent surgical resection were used. Pathological tissues were investigated in terms of the DNA base and nucleoside damage and compared to healthy control tissues. The level of 8,5-cyclo-2'-deoxyadenosine (S-cdA) were found to be significantly higher in cancer tissues than those in control tissues ($p=0.0063$). On the other hand 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) levels showed no significant difference between two groups. No significant correlation was found between oxidative DNA damage and age, smoking, clinical or pathological stage.

In conclusion we showed, for the first time, the accumulation of wide variety of major products of oxidative damage to DNA in lung tumor tissues. Further research should deal with prevention of accumulation of oxidative DNA damage and elucidation of DNA repair defects and also possible enhancement of DNA repair in NSCL patients.

Key Words: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), Oxidative DNA Damage, S-cdA, FapyGua, 8-OH-Gua

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAC

Günümüzde, akciğer kanseri, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak dünyada en sık görülen kanser türüdür ve kanser ölümlerinin önemli bir yüzdesinden sorumludur. Hastalığın gelişiminde başta aktif sigara kullanımı olmak üzere mesleki maruziyetler, hava kirliliği, diyet ve genetik özellikler önemli rol oynamaktadır(1,2).

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir (3). Reaktif oksijen türleri, karbohidrat, protein ve lipid gibi biyomoleküllerin yanı sıra stabil bir molekül olan DNA'yı da kimyasal olarak oksidatif hasara uğratabilmektedir. Başta hidroksil radikali (OH) olmak üzere oksijenden köken alan bu serbest radikaller DNA ve nükleoprotein üzerinde geniş çaplı modifikasyonlara yol açarlar⁴. Bu değişiklikler modifiye bazlar, okside şekerler, tek veya çift zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlanmaları şeklinde kendini gösterir (4). Hidroksil radikalının heterosiklik DNA bazlarına saldırması ile başlayan bir dizi reaksiyon sonucunda meydana gelen yirmiden fazla son ürün DNA molekülünün kararlılığını bozmaktadır (5). DNA üzerinde modifiye bazların oluşturduğu lezyonların genler üzerinde transkripsiyona uğrayacak bölgelerdeki varlığı mutasyonlara neden olabilir (6). Bazı kanserlerde oksidatif DNA hasarı düzeyinde artış görülürken, bazılarında DNA onarımının artışı ile paralel olarak hasarda azalma saptanmaktadır (Oktay G. ve Öztürk M. yayınlanmamış veriler). DNA hasarının kanser oluşumunun tüm evrelerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (5). Ayrıca kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması DNA hasarı ile ortaklaşa kanserin malignitesine artırıcı yönde etki etmektedir (6)

Akciğer tümör DNA'sında oksidatif baz hasarı konusunda yapılan çalışmaların oldukça sık kullanılan bir oksidatif stres belirteci olan 8-OH-dG'nin idrar ve doku düzeyindeki ölçümüne yoğunlaştığı görülmektedir (8,9,10). Çalışmamızda

küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan alınan tümör dokusu ve normal dokunun DNA baz ve nükleozid hasarı bakımından karşılaştırılması, söz konusu hücrelerde DNA tamir mekanizmalarının araştırılması, ayrıca akciğer kanseri evresi, sigara içme durumu ve yaş ile DNA'daki oksidatif baz hasarı arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, dünya çapında en sık görülen, sağ kalım süresi ve prognoz bakımından en tehlikeli kanser türüdür (11). Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanserine bağlı olarak 2008'de, öngörülen 161,840 sayıdaki ölüm, gerçekleşmesi beklenen tüm kanser ölümlerinin %29'unu oluşturmaktadır. Günümüzde akciğer kanseri erkeklerde bütün kanser ölümlerinin %34'nü, kadınlarda %22'sini oluşturmaktadır. Akciğer kanserinden ölen kadınların sayısı 1987 yılından itibaren meme kanserinden ölenlerden daha fazladır. İnsidans özellikle batı toplumlarındaki kadınlarda erkeklere göre daha hızlı artış göstermektedir. Bu durum son yıllarda kadınlar arasında da sigara içme alışkanlığının artmasıyla açıklanmaya çalışılmaktadır. Sigara, akciğer kanserinde risk faktörleri arasında çok büyük farkla birinci sıradadır ve akciğer kanserlerinin % 90'nından sorumludur. Risk tüketilen sigaranın miktarı ve tüketim süresi ile doğru orantılıdır. Diğer risk faktörleri arasında pasif içicilik, radon, asbest, çeşitli metaller (krom, kadmiyum, arsenik), bazı organik kimyasallar, radyasyon, çevre kirliliği, mesleki ve çevresel maruziyet sayılabilir (12).

2.1.1. Akciğer kanserinin evrelemesi

Akciğer kanserinin evrelendirilmesi için Amerikan Birleşik Kurulu (American Joint Committee)'nun primer tümörün büyüklüğü ve yayılımına (**T**), bölgesel lenf bezi tutulumuna (**N**), uzak metastaz varlığına (**M**) dayanan **TNM** yöntemi kullanılır. TNM sisteminin 1996 yılında yeniden geliştirilmesi ile skuamöz, büyük hücreli ve adenokarsinomlu (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri-KHOAK, *Non-small Cell Lung Carcinoma-NSCLC*) hastalar yapılacak tedavi ve prognoz yönünden Evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflandırılmaktadır. Küçük hücreli kanser hastalarında TNM sistemi yerine *VALG* (*Veterans Administration Lung Cancer*

Group) tarafından önerilen evreleme sistemi kullanılmaktadır. Buna göre hastalık bir hemitoraksta lokalize ise "*sınırlı*" ve hemitoraksın dışına yaygın ise "*yaygın*" olarak evrelendirilmektedir. Fakat TNM evreleme sistemi küçük hücreli hastalarda da kullanılabilir (13). **Tablo 2.1** ve **Tablo 2.2**'de akciğer kanserinin TNM sınıflandırılması görülmektedir (14).

Tablo 2.1 TNM sınıflamasına göre evrelendirme (16)

0	Karsinoma <i>in situ</i> T _{is} , N ₀ , M ₀
I	I A: T ₁ , N ₀ , M ₀
	I B: T ₂ , N ₀ , M ₀
II	II A: T ₁ , N ₁ , M ₀
	II B: T ₂ , N ₁ , M ₀ T ₃ , N ₀ , M ₀
III	IIIA: T ₃ , N ₁ , M ₀ T ₁₋₂₋₃ , N ₂ , M ₀
	IIIB: T ₄ , N, M ₀ T, N ₃ , M ₀
IV	T, N, M ₁

2.1.2. Akciğer kanserinin sınıflandırılması

Akciğer kanserinin temel iki tipi **küçük hücreli olmayan akciğer kanseri-KHOAK** (% 85'i) ve **küçük hücreli akciğer kanseri-KHAK**'dir (%15) (11) (**Tablo 2.3**).

Tablo 2.2 TMN sınıflaması (16)

PRİMER TÜMÖR (T)

T₀: Primer tm belirtisi yok

T_{is}: Karsinoma in situ

T₁: Geniş çapı <3cm, akciğer ve visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale uzanmayan

T₂: Geniş çapı >3cm, ana bronşlarda yerleşen ancak ana karinaya uzaklığı > 2cm olan, visseral plevraya kadar uzanan, atelektazi veya pnömoniye neden olan

T₃: Herhangi büyüklükte olan tümörün göğüs duvarı, diafragma, mediastinal plevra, perikard gibi yapılara invaze olması, ana bronş içinde karinaya 2 cm dan yakın yerleşmesi, tüm akciğeri kaplayan atelektazi veya pnömoniye neden olması

T₄: Herhangi büyüklükte olan tümörün mediasten yağ dokusu, kalp, büyük damarlar, trakea özofagus, vertebral kolon, karina gibi yapıları tutması, malign plevral veya perikardial sıvı bulunması, tümör ile aynı lob içinde satelit nodül bulunması

BÖLGESEL LENF BEZİ (N)

N₀: Bölgesel lenf bezi yok

N₁: İpsilateral peribronşial ve/veya hiler lenf bezi metastazı (akciğer içi lenf bezi)

N₂: İpsilateral mediastinal lenf bezi metastazı (Subkarinal dahil)

N₃: Kontrilateral mediastinal veya supraklaviküler lenf bezi metastazı

UZAK METASTAZ (M)

M₀: Uzak metastaz yok

M₁: Uzak metastaz var

Tablo 2.3 Akciğer tümörleri sınıflandırması (16)

<p>1. KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ</p> <p>Küçük hücreli karsinom</p> <p>2. KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ</p> <p>Skvamöz hücreli karsinom</p> <p>Adenokarsinom</p> <p>Büyük hücreli karsinom</p> <p>Adenoskuamöz karsinom</p> <p>Pleomorfik, sarkomatoid ya da sarkomatöz elemanlarla birlikte olan karsinomlar</p> <p>Karsinoid tümörler</p> <p>Tipik karsinoid</p> <p>Atipik karsinoid</p> <p>Tükruk bezi tipindeki karsinomlar</p> <p>Mukoepidermoid karsinom</p> <p>Adenoid kistik karsinom</p> <p>3. SINIFLANDIRILAMAYAN KARSİNOM</p>
--

2.1.2.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Prognostik özelliklerinin benzerliği ve tedaviye verdikleri yanıtın yakınlığı bakımından **skvamöz hücre karsinomu, adenokarsinom ve büyük hücreli akciğer**

karsinomu aynı grupta toplanarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak tanımlanmaktadır (14).

Erken belirleme ve standart tedavideki gelişmeye rağmen, küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri genellikle ileri evrelerde teşhis edilir ve kötü bir prognoza sahiptir (11).

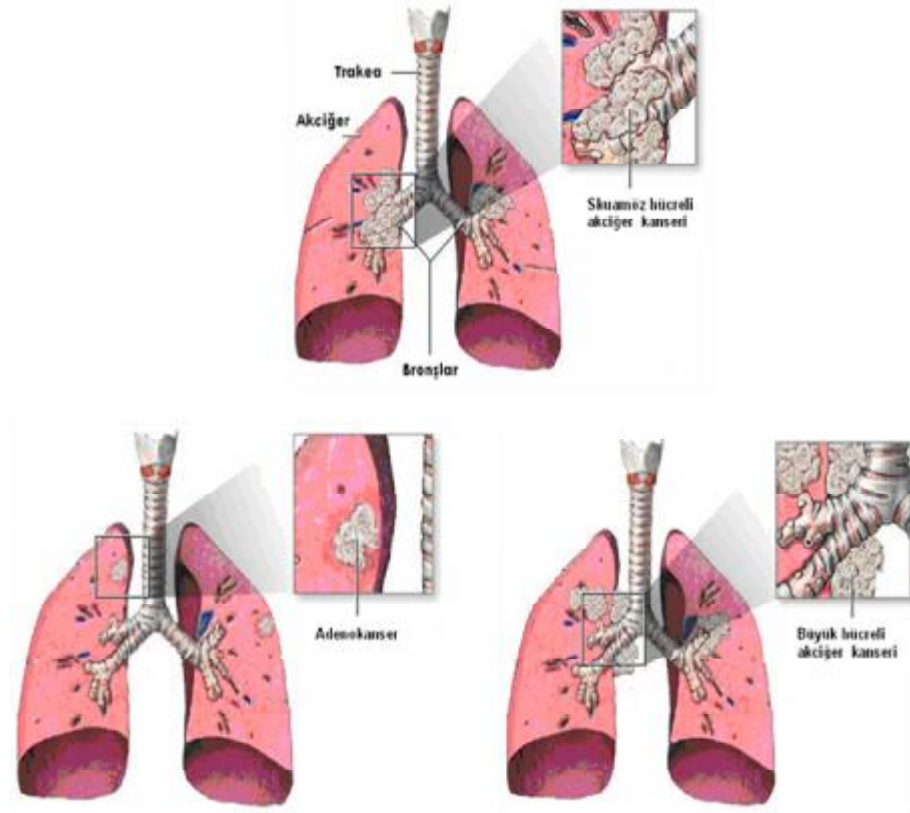
Skvamöz hücreli kanser, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturur ve çoğunlukla sigara içenlerde görülür. Skvamöz hücre kanserleri genellikle lokal kalma eğilimi gösterirler. Tedaviden sonraki lokal tekrarlamalar ise bu kanser tipinde daha fazladır.

Adenokarsinom ve **büyük hücreli kanserler** tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 60'ını oluştururlar. Adenokarsinom daha çok sigara içmeyenlerde ve kadınlarda çoğunlukla akciğerlerin dış kısımlarında görülür. Küçük solunum yollarından ve alveol adı verilen solunum keseciklerinden köken alırlar ve göğüs duvarına kolayca yayılabilirler. Bu açıdan bu tip kanserlerin metastaz yapma eğilimleri daha fazladır (15). Bronşiyoloalveoler karsinom (BAC), pulmoner adenokarsinomun önemli bir alt tipidir (17).

Büyük hücreli akciğer kanserleri ise, akciğer kanserlerinin % 5-10'unu oluşturur. Çoğunlukla küçük solunum yollarından köken alır ve akciğerin kenar kısımlarında yerleşir. Klinik seyirleri adenokanserler gibi uzun sürelidir (18) (**Şekil 2.1**).

2.1.3. Akciğer kanseri moleküler patolojisi

Moleküler biyoloji alanında gelişen teknoloji insan akciğer kanserindeki genetik değişikliklerin tanımlanmasına izin vermektedir (19). Akciğer kanserinin gelişimi diğer kanser türleri gibi çeşitli yolların ve pek çok genin rol aldığı çok aşamalı bir süreçtir (20). Başta kanser metabolizmasındaki olmak üzere çeşitli genlerdeki kalıtsal polimorfizmler özellikle çevresel maruziyetler ile birleştiğinde bireylerde akciğer kanseri gelişme olasılığı artmaktadır (21,74). Ancak epidemiyolojik çalışmalar, hayat boyu sigara içenlerin yalnızca % 5-10'unda akciğer kanseri gelişmesinin genetik yatkınlığı yansıttığını ve mendelyen otozomal bir şekilde kalıtılabileceğini öne sürmektedir (22).



Şekil 2.1 Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin başlıca tipleri (201)

Mutasyonlar sonucu onkogenlerin aktif hale gelmesi, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre siklusunun regülasyonunda ve DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler ile büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler, akciğer kanserinin oluşumundaki temel genetik olaylardır (23,24).

2.2. OKSİDATİF DNA HASARI

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, küçük moleküler ağırlığa sahip etkin kimyasal türler olarak tanımlanırlar ve hücrelerde endojen veya ekzojen kaynaklar aracılığıyla meydana gelirler (25). Normal hücresel metabolizma bu metabolitler için oldukça uygun bir

ortam oluşturmaktadır (26). Oksijenin aerobik yaşam için, solunum ve enerji üretimi süreçlerinde iş görmesi nedeniyle hücrede mutlak suretle reaktif oksijen türleri üretilmektedir (27). Dolayısıyla canlı hücreler devamlı olarak reaktif oksijen türleri (ROT)'nin potansiyel hasarı ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu reaktif türler hücrel solunumun yan ürünü ya da inflamatuvar yanıtın bir bileşeni olarak üretilmelerinin yanında iyonlaştırıcı radyasyon veya geçiş metallerinin, kimyasal oksidanların veya serbest radikallerin çevresel maruziyeti sonucu da oluşabilmektedirler (28). Reaktif oksijen türlerine en yüksek reaktiviteye sahip **hidroksil radikali (·OH)** başta olmak üzere, **süperoksit radikali (O₂⁻)** ve radikal olmayan **hidrojen peroksit (H₂O₂)** örnek verilebilir. Canlı hücreler, ROT ve diğer serbest radikallerden korunmak amacıyla sayısız savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar arasında, küçük molekül ağırlıklı bileşikler, serbest radikal yakalayıcı özellikte olan C ve E vitamini gibi antioksidanlar ve ROT düzeyini sınırlayan süperoksit dismutaz, katalaz, ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler bulunmaktadır (29). Bu oksidan ve antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması **oksidatif stres** olarak adlandırılan duruma neden olur ve bu süreçte hücrel hasar düzeyi artar (28). Reaktif oksijen türlerinin hücrel hedefleri arasında DNA, lipid, karbohidrat ve proteinler yer almaktadır. Oluşan modifikasyon, ROT üretiminin yeri, oksidasyona uğratacakları biyomoleküle ulaşabilirlikleri ve metal iyonlarının varlığı gibi pek çok etkene bağlıdır (29).

Yüksek reaktiviteye sahip olduğu bilinen hidroksil radikali (·OH) başta olmak üzere oksijenden türev alan serbest radikaller, DNA'nın bileşenleri ile reaksiyona girerek DNA'nın yapısını bozarlar (30). DNA'nın bu tipteki hasarı '**oksidatif DNA hasarı**' olarak adlandırılmaktadır (31). Serbest radikallerin DNA ve nükleoproteinler üzerinde gerçekleştirdiği kimyasal değişiklikler sonucu modifiye bazlar ve şekerler, abazik bölgeler, ardışık lezyonlar, zincir kırılmaları ve DNA protein çapraz bağlanmaları meydana gelir. DNA'nın bu şekilde yapısının bozulması çeşitli mutasyonlara ve bunu takiben kanser, nörodejeneratif rahatsızlıklar ve yaşlanma gibi sayısız hastalığa neden olmaktadır (30).

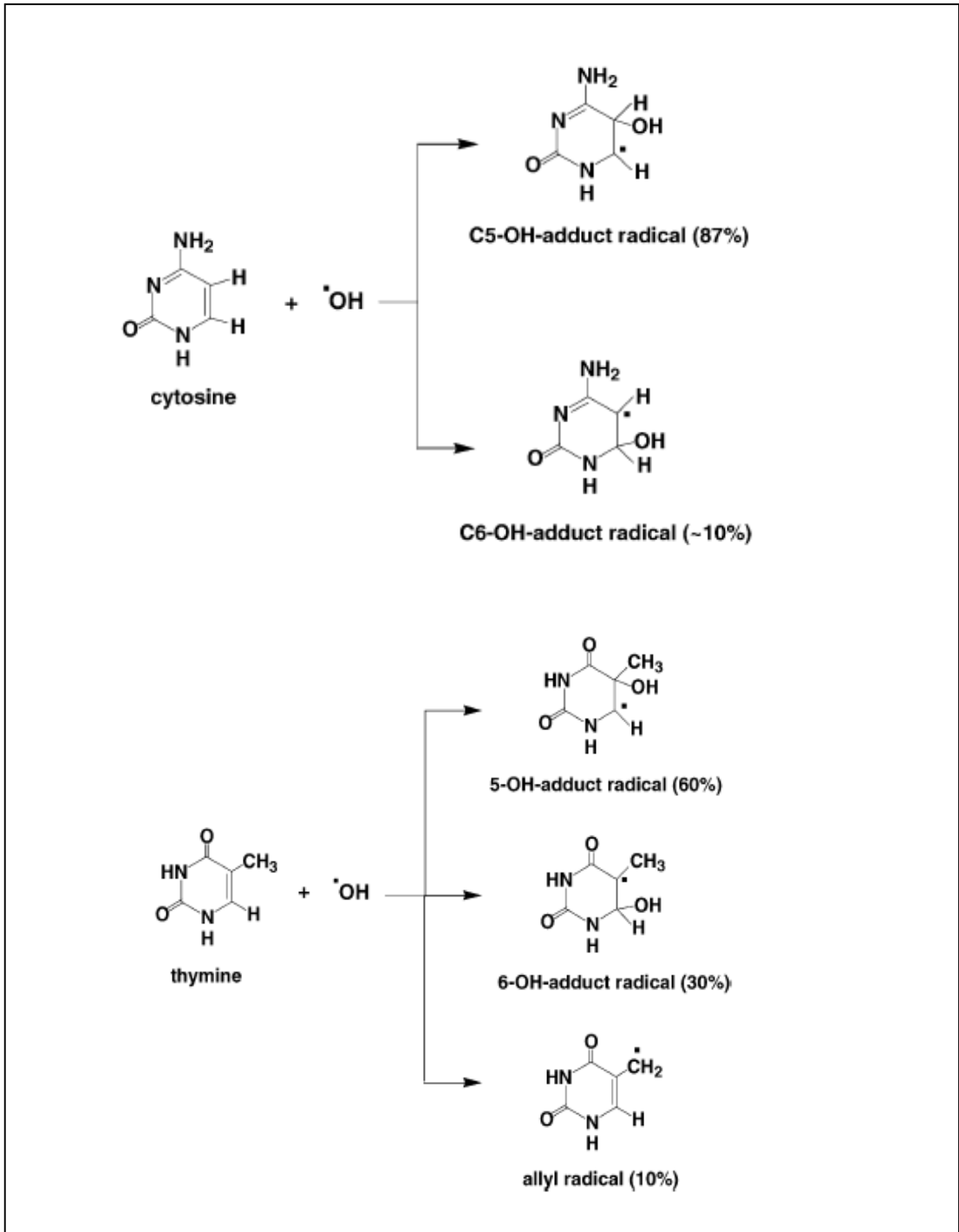
2.2.1. DNA baz hasarı

Başta hidroksil (·OH) olmak üzere tüm serbest radikaller organik bileşikler ile ekleme veya çıkarma reaksiyonu gerçekleştirirler. Hidroksil radikali pürin ve

pirimidin bazlarının çift bağlarına difüzyon-kontrollü olarak bağlanır. OH saldırılarının yaygınlığı oksidasyona uğrayacak molekülün elektron yoğunluğuna bağlıdır. Elektrofilik doğası nedeniyle OH tercihen en yüksek elektron yoğunluğu olan bölgeye eklenir (32).

2.2.1.1. Hidroksil radikalinin pirimidinlerle yaptığı reaksiyonlar

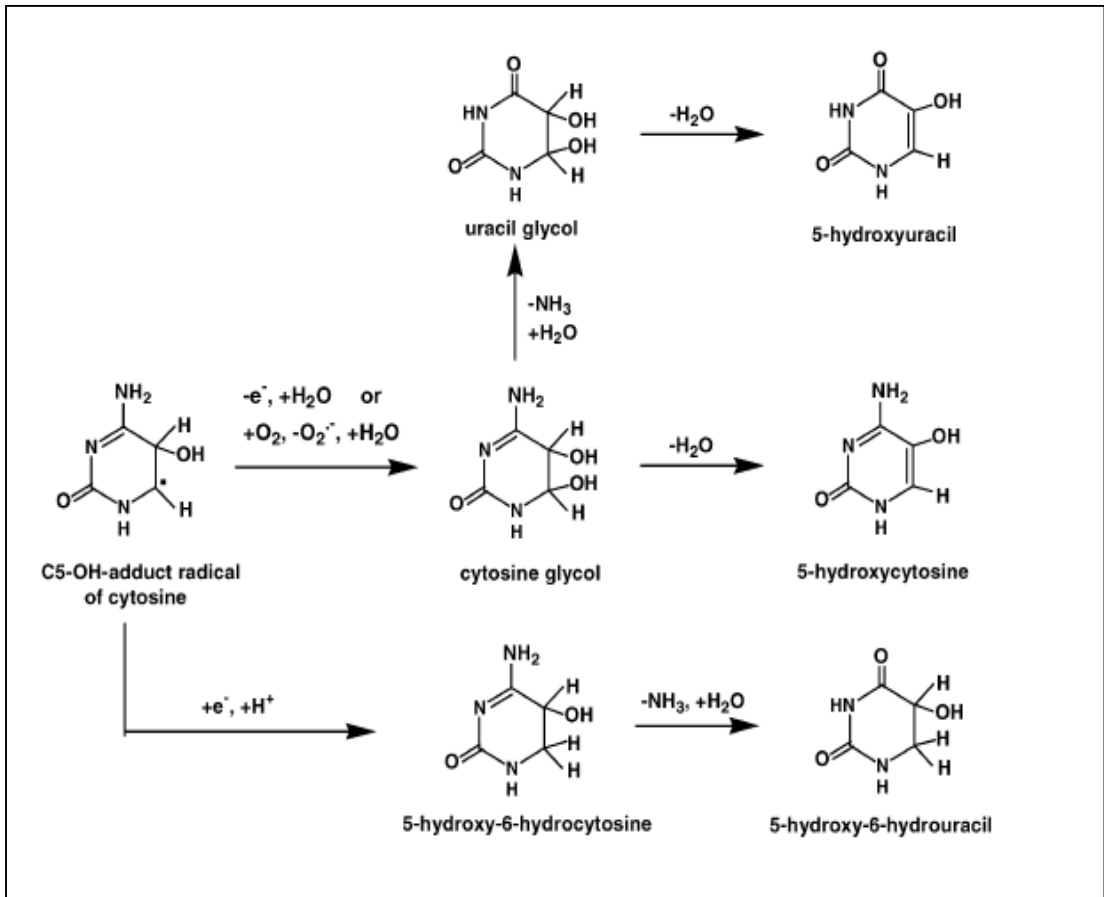
Sitozinde eklenme 5.Karbon (C5)'da %87, 6.Karbon (C6)'da % 10 oranında gerçekleşir. Timinde ise bu oran sırasıyla % 60 ve % 30 şeklindedir. OH'ın yaklaşık olarak %10'u metil grubundan H atomunu uzaklaştırır. C5=C6 çift bağına eklenme sonucu ise sitozin ve timinin **C5-OH-** ve **C6-OH-** eklenti radikalleri oluşur. H'nin uzaklaşması ile ise timinin allil radikali oluşur (33-35) (**Şekil 2.2**). Pirimidinlerin OH-eklenti ve allil radikalleri redoks özelliklerine, redoks ortamına ve reaksiyon eşlerine göre yükseltgenerek veya indirgenerek çeşitli ürünler verirler (35-37). Oksijen ve diğer oksidanlar, indirgeyici ajanlar ve diğer deneysel koşullar ürünlerin tipini ve verimini son derece etkilemektedir (36-37). Sitozin ve timinin C5-OH-eklenti radikallerinin oksidasyonu sonucu oluşan **sitozin glikol (Cg)** ve **timin glikol (Tg)** oluşumunu oksijen yokluğunda OH⁻ eklenmesi veya protonun uzaklaştırılmasının izlediği su eklenmesi takip eder (32,35,37,38). Timinin allil radikalinin oksidasyonu sonucu ise **5-hidroksimetilurasil (5-OHMeUra)** oluşur.



Şekil 2.2 $\cdot\text{OH}$ radikalinin pirimidinlerle reaksiyonları (29)

Moleküler oksijenin varlığında, oksijen C5-OH-eklenti radikaline difüzyon kontrollü hızlarda bağlanır ve C5-OH-6-peroksil radikalini oluşturur. Bu radikal daha sonra süperoksit (O_2^-)'i yok eder ve su ile reaksiyona girerek sitozin glikol ve timin glikol ürünlerini oluşturur (32,39). Oksijenin allil radikaline eklenmesi benzer mekanizma ile **5-OHMeUra** ve **5-formilurasil (5-FoUra)** oluşumuna yol açar.

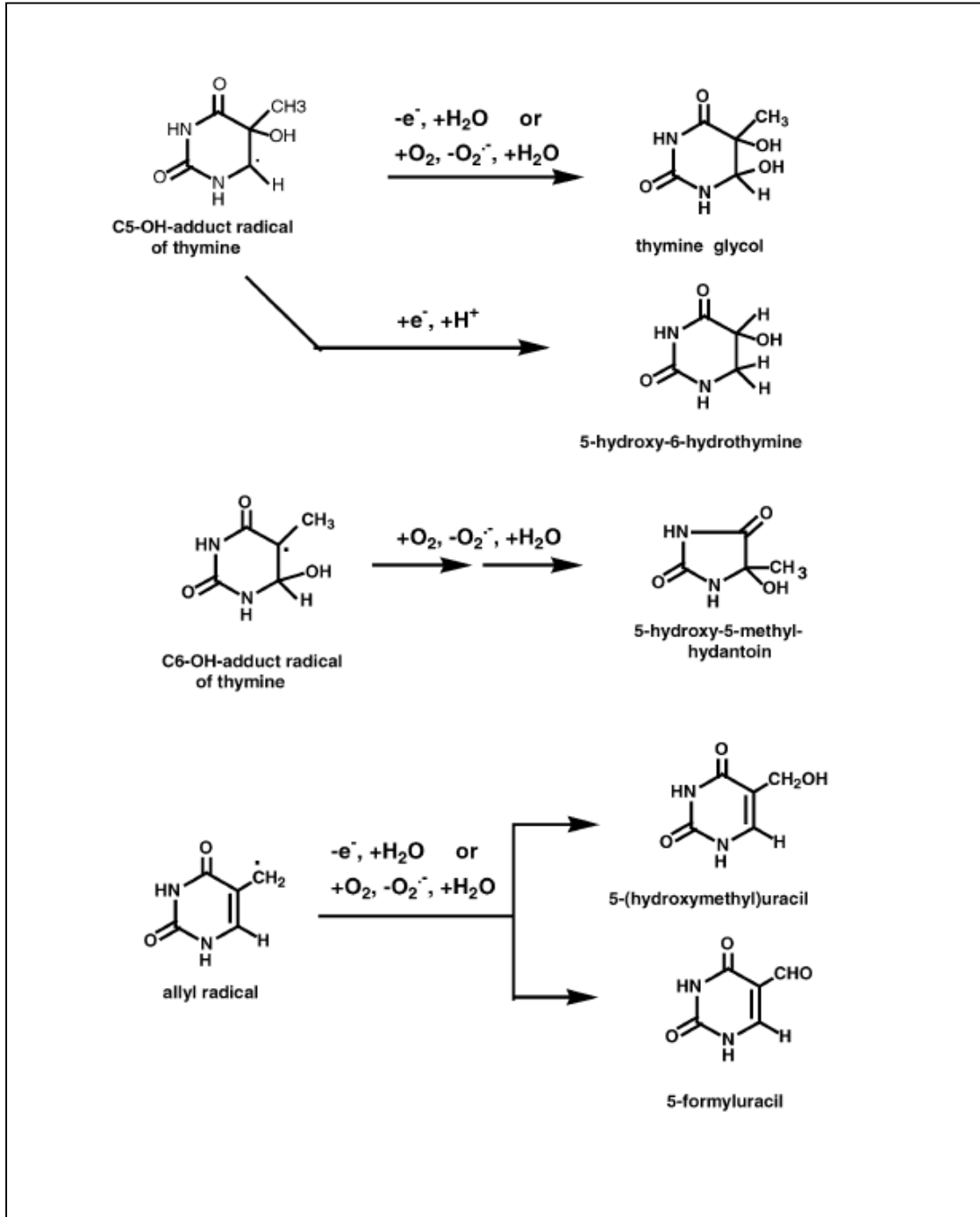
Ayrıca pirimidin peroksil radikalleri önce indirgenip daha sonra protonlanarak hidroksihidroperoksitleri oluştururlar (39). Bu bileşikler ileri reaksiyonlarla parçalanarak timin glikol, **5-hidroksi-5-metilhidantoin**, 5-formil urasil, 5-hidroksimetil urasil gibi ürünlere dönüşürler (39,40). Sitozin ürünleri deaminasyona ve dehidrasyona uğrayabilirler. Sitozin glikolün deaminasyonu ve dehidrasyonu sonucu **urasil glikol (Ug)**, **5-hidroksi sitozin (5-OH-Cyt)** ve **5-hidroksi urasil (5-OH-Ura)** ortaya çıkar (36,37) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Oksijen yokluğunda sitozinin C5-OH-eklenti radikalinden ürün oluşumu (29)

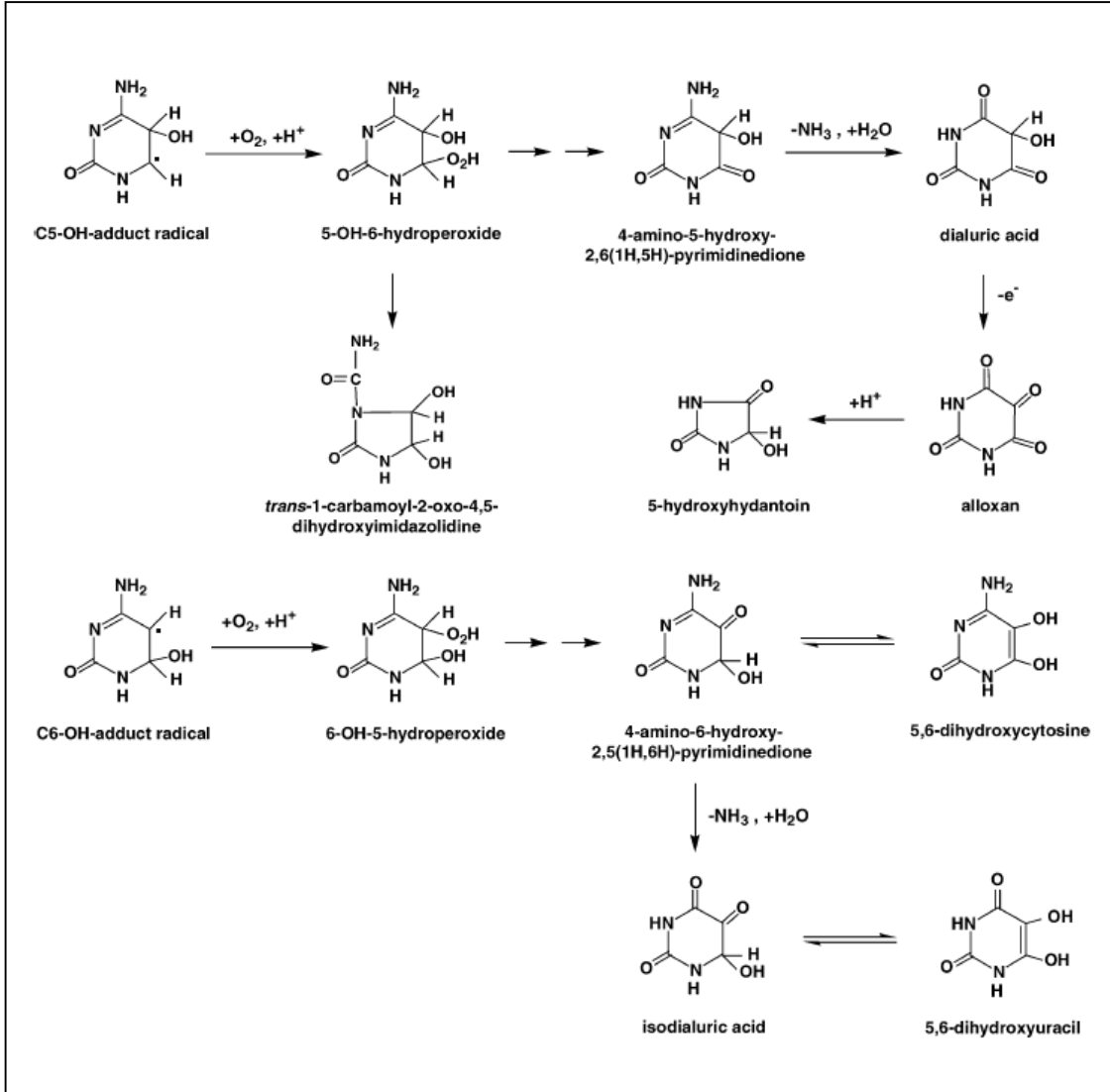
Oksijen yokluğunda ise sitozin ve timinin C5-OH-eklenti radikalleri indirgenirler. Daha sonrasında ise protonlanarak sırasıyla **5-hidroksi-6-hidroksitozin (5-OH-6-HCyt)** ve **5-hidroksi-6-hidrotimin (5-OH-6-HThy)**'i oluştururlar. Benzer

şekilde pirimidinlerin C6-OH eklenti radikallerinin indirgenmesi sonucu **6-hidroksi-5-hidropirimidinler** oluşur (41-43) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Timinin C5-, C6-OH-eklenti ve allil radikalinin ürün oluşumu (29)

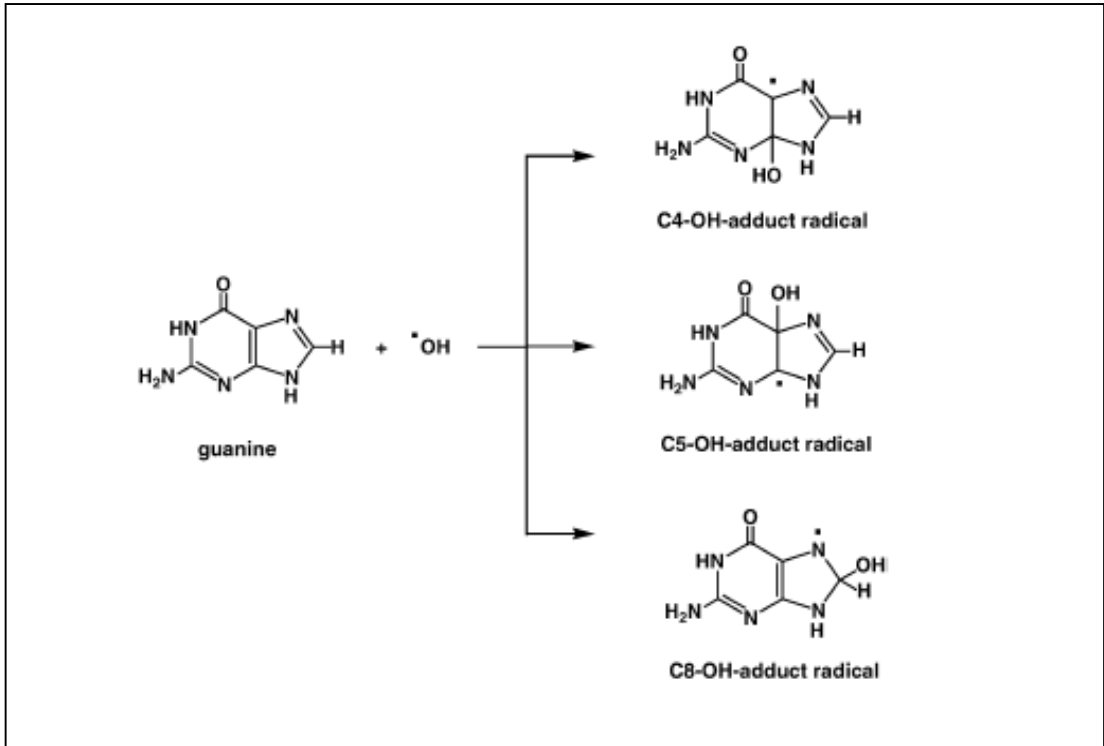
5-hidroksi-6-hidro- ve 6-hidroksi-5-hidropirimidinlerin oluşumu oksijen varlığında inhibe edilir. Bunun sebebi, oksijenin C5-OH- ve C6-OH-eklenti radikalleri ile difüzyon kontrollü hızlarda reaksiyona girerek peroksil radikallerini oluşturmasıdır. Sitozinin C5-OH-6-peroksil ve C6-OH-5-peroksil radikallerinin ileriki reaksiyonları ile sırasıyla sitozin **5-OH-6-hidroksiperoksit** ve **6-OH-5-hidroperoksit** radikalleri oluşur (42,44,45) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Oksijen varlığında sitozinin C5- ve C6-OH-eklenti radikallerinden ürün oluşumu (29)

2.2.1.2. Hidroksil radikalinin pürinlerle yaptığı reaksiyonlar

Pürin bazlarından guaninde C4-, C5- ve C8-pozisyonlarına $\cdot\text{OH}$ radikalinin eklenmesi sonucu guaninin C4-OH, C5-OH ve C8-OH-eklenti radikalleri oluşur (46-48). Adenin gibi diğer purin molekülleri de analog reaksiyonlar gerçekleştirirler (47-49). Pürinler, OH-eklenti radikalleri açısından farklılık gösterirler. C4-OH-eklenti radikali oksidasyona uğrarken, C5-OH- ve C8-OH-eklenti radikali indirgenir. Bu radikallerinin dehidrasyonu sonucu bir pürin ($-\text{H}$) radikali oluşur ve bu reaksiyonu indirgenme ve protonlanma izler (47,48,50). Dehidrasyon nötral pH'da, adenin ve guanin için farklı reaksiyon hızlarında gerçekleşir (48,49) (Şekil 2.6).

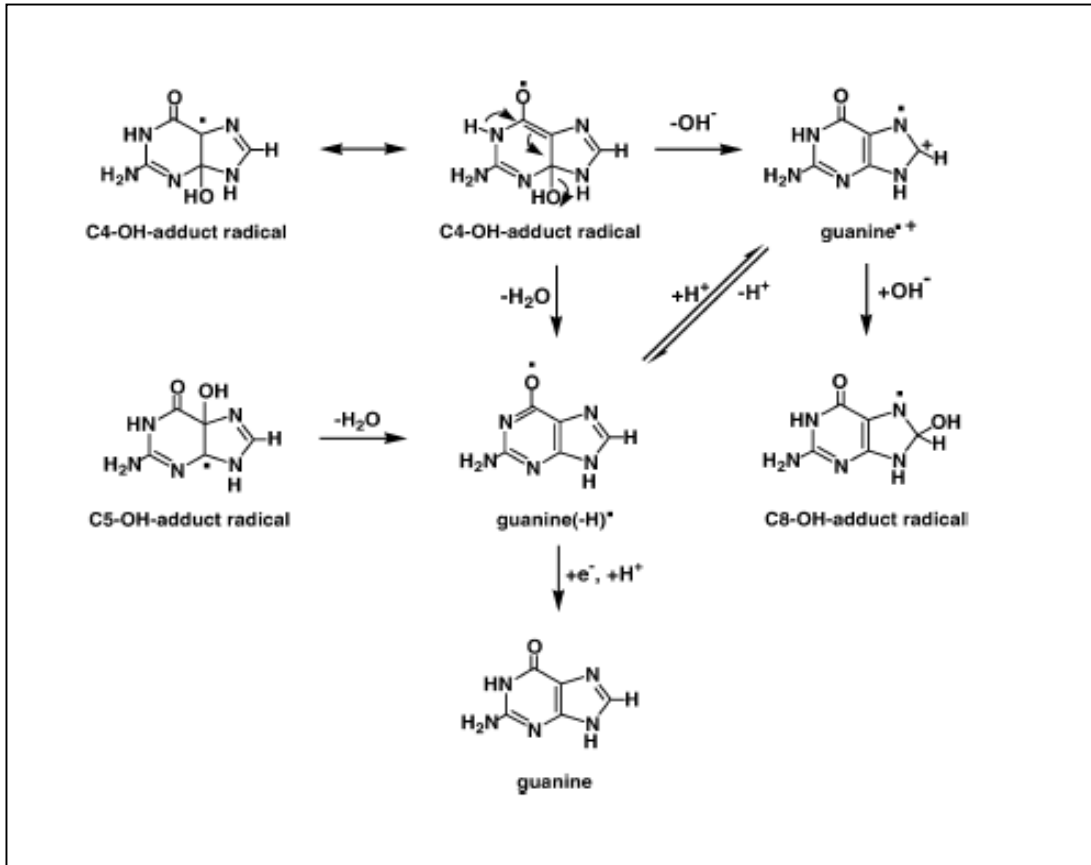


Şekil 2.6 OH radikalinin pürinlerle reaksiyonları (29)

Ayrıca guaninin C4-OH-eklenti radikali OH^- 'i uzaklaştırır ve pH'a bağlı olarak protonlanması sonucu guanin ($-\text{H}$) radikalini veren guanin radikal kationunu (guanin $^+$) oluşturur (48). Ek olarak ürün analizleri temelinde çift zincirli DNA'da bulunan guanin radikal kationunun hidrasyonu (OH^- eklenmesi) sonucu, sonrasında

oksidasyon ile **8-hidroksiguanin (8-OH-Gua)**'e dönüşen C8-OH-eklenti radikalinin oluştuğu bilinmektedir (51,52) (Şekil 2.7).

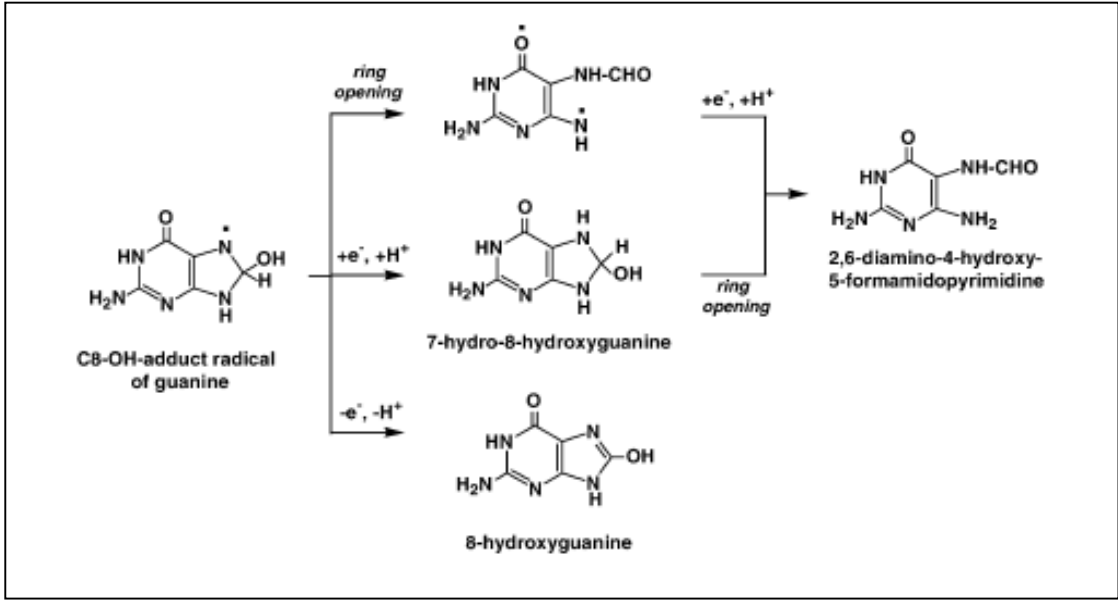
Oksijen, guanin(-H) radikali ile kolayca reaksiyon verir. Bu reaksiyon sonucu **imidazolon** ve **oksazolon** türevleri oluşur (53-56). Oksijen ayrıca guanin ve adeninin C8-OH-eklenti radikalleri ile difüzyon kontrollü reaksiyon gerçekleştirir. Bu radikallerin DNA'da tek elektron oksidasyonu sonucunda 8-hidroksipürinler açığa çıkar (47,49).



Şekil 2.7 Guaninin C4- ve C5-OH eklenti radikallerinin reaksiyonları (29)

Bu reaksiyonlara ek olarak gerçekleşen diğer reaksiyon imidazol halkasının unimoleküler açılma sonucu açık halkalı bir radikal meydana getirdiği reaksiyondur. Bu radikal tek elektron oksidasyonuna uğrayarak formamidopirimidinleri oluşturur. Bunlar guaninden türevlenen **2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua)** ve adeninden türevlenen **4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde)** bileşikleridir (36,37) (Şekil 2.8).

Çalışmamızda yukarıda sözü edilen baz hasar ürünlerinin çoğunun GC-MS ve/veya LC-MS’de verdikleri pikleri inceledik. Ancak çok bilinen veya istatistiksel olarak anlamlı olanları çalışmamız dahilinde değerlendirdik.

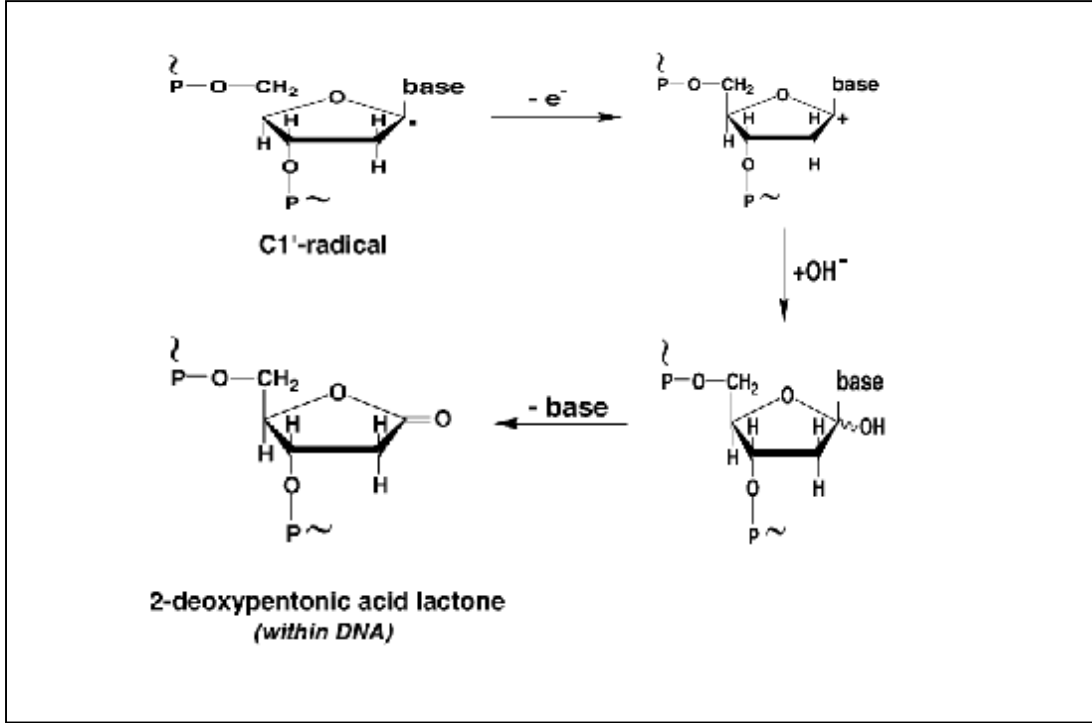


Şekil 2.8 Oksijen yokluğunda guaninin C8-OH-eklenti radikalinden ürün oluşumu (29)

2.2.2. Şeker Hasarı

Hidroksil radikali DNA’daki şeker artıklarının her bir karbon atomundan bir H atomunu uzaklaştırarak C-merkezli radikaller oluşturur. Bu radikaller daha ileri reaksiyonlar ile çeşitli şeker modifikasyonlarına yol açarlar. Ürün analizlerine bakıldığında OH⁻ tarafından oluşturulan şeker hasarı DNA zincir kırıklarını da içeren bir mekanizma ile açıklanmaktadır (57-60). Bazı şeker ürünleri DNA’dan salınırken, bazıları ise DNA’da kalarak DNA zincir kırıklarının uç gruplarını oluştururlar. DNA’daki şeker moleküllerinin C4’-radikalindeki değişikliklerin mekanizması ile ilgili olarak, bu radikal öncelikle oksidasyona uğrar, sonrasında su ile reaksiyona girer ve değişmemiş bazın uzaklaştırılması sonucu DNA’da bir **2-deokspentoz-4-uloz** artığı oluşur. Oksijen yokluğunda DNA’daki zincir kırıkları temel olarak C4’-radikalinin reaksiyonlarından kaynaklanır (61,62).

C1'-radikali aynı reaksiyonlar sonucu DNA zincirinde **2-deoksiribonik asit lakton** meydana getirir (Y59) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Oksijen eksikliğinde şeker artığının C1'-radikalinden ürün oluşumu (29)

C2'-radikalinden köken alan peroksil radikallerinin parçalanmasının ise DNA içinde parçalanmış şeker halkası ürünü eritrozun meydana gelmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan C1'-peroksil radikalinin de halka bölünmesine ve sonrasında eritroz oluşmasına neden olduğu savunulmaktadır (63,64).

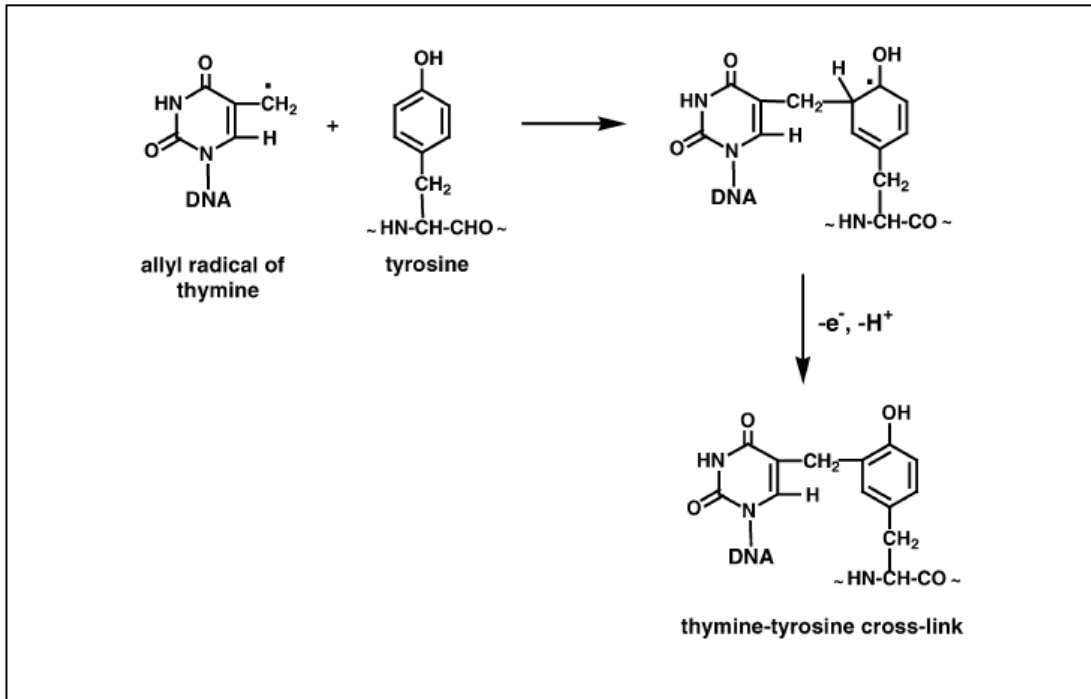
C5'-peroksil radikali ile başlayan benzer mekanizmada 2-deoksitetradialdozun serbest bir modifiye şeker ya da 5' ucu olarak meydana geleceği düşünülebilir (65,66). Modifiye şekerlere ek olarak, glikozidik bağın zayıflamasından kaynaklanan modifiye bazların uzaklaştırılması sonucu DNA'da **bazsız (abazik) bölgeler** olarak adlandırılan değişime uğramamış şeker artıkları oluşur (32).

2.2.3. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler

Bu lezyonlar, C5'-merkezli şeker radikalinin aynı pürin nükleozidindeki C8 pozisyonuna eklenmesi ile oluşurlar. Bu molekül içi halkalanmayı oksidasyon takip eder ve **8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin (siklo-dG)** ve **8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (siklo-dA)** ardışık lezyonları oluşur. Bu lezyonların oluşumu DNA'da hem baz hem de şeker artıklarının hasarına neden olur (66-69). Oksijenin varlığında üretilmezler çünkü oksijenin C5'-merkezli radikal ile yaptığı difüzyon kontrollü reaksiyon önceliklidir (29).

2.2.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları

Hücrelerin iyonize radyasyon gibi serbest radikal üreten sistemlere maruz kalmaları sonucu kovalent DNA-protein çapraz bağlanmaları oluşur (57,70). Reaksiyon ya DNA baz radikalinin proteinin aromatik amino asidine eklenmesi ile ya da DNA baz radikali ile bir amino asit radikalinin kombinasyonu sonucu oluşur (71-73) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Kromatinde timin-tirozin çapraz bağlanmalarının oluşumu (29)

2.3. DNA TAMİR MEKANİZMALARI

Birinci bölümde de değinildiği gibi reaktif oksijen türleri (ROT) aerobik organizmalarda mitokondriyal solunum, β -oksidasyon ve sitokrom P450 metabolizmasının yan ürünleri olarak sürekli üretilmektedir (74). ROT'un hücre içindeki miktarı redoks ajanları ve iyonize radyasyon maruziyeti gibi dış kaynaklar sonucu daha yüksek bir değere ulaşmaktadır. ROT, diğer moleküllerin yanı sıra, DNA üzerinde okside baz lezyonları, abazik(AB) bölgeler ve tek veya çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (75). Kalıcı oksidatif DNA hasarı sinyal yollarını, gen ekspresyonu aşamasında değişikliğe uğratabilir, transkripsiyonu tetikleyebilir veya engelleyebilir, replikasyon hatalarına ve genomik instabiliteye neden olabilir.

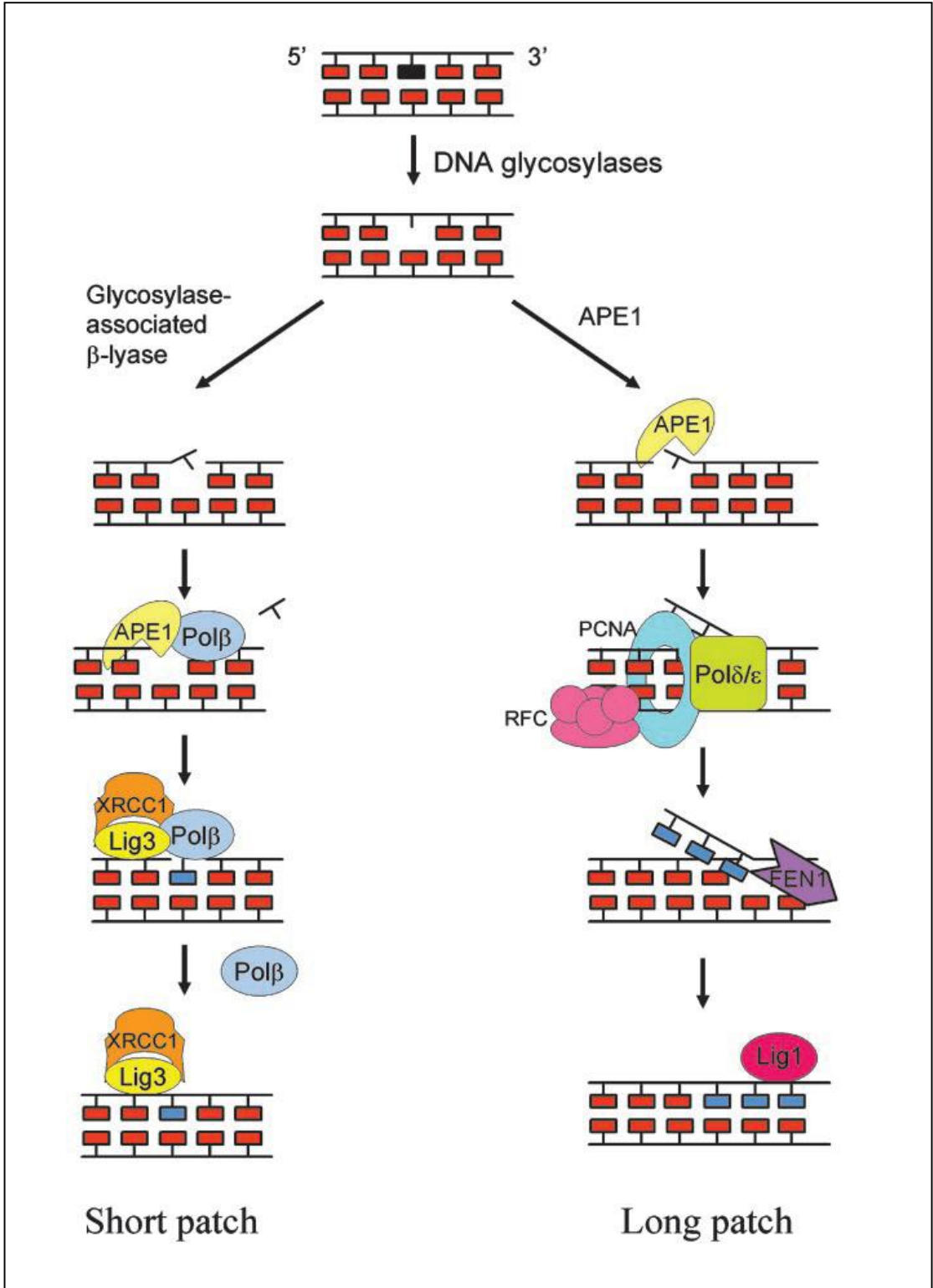
Normal hücreler, ROT üretimine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptir. Ancak bu hücrelerde oksidan ve anti-oksidanlar arasındaki dengenin ortadan kalktığı 'oksidatif stres' durumunda hücre hasar düzeyi artmaktadır (28). Deneysel olarak da gösterilmiştir ki bu lezyonlar farklı fakat pek çok durumda birbiri ile örtüşen tamir mekanizmaları ile uzaklaştırılmaktadır (29). Canlı hücrelerde oksidatif DNA lezyonları, tamir mekanizmalarında iş gören enzimlerdeki hasarlar veya bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmalar onarılmadığı takdirde genomik kararsızlığı artıran mutasyonlara neden olmaktadır (76). Dolayısıyla tamir mekanizmaları oksidatif hasara bağlı pek çok genetik hastalığın yanında kanser ile de yakından ilişkilidir.

Okside DNA baz lezyonları esas olarak iki çeşit enzim aktivitesi ile uzaklaştırılırlar. Baz kesme-çıkarma onarımı (*Base Excision Repair-BER*) glikozilaz aktivitesi ile tekli lezyonun uzaklaştırılmasını sağlarken, nükleotid kesme-çıkarma onarımı (*Nucleotide Excision Repair-NER*) lezyonu içeren oligonükleotidin kesilip atılmasını kapsayan daha karmaşık bir mekanizmadır (26)

2.3.1. Baz Keme-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair-BER)

Baz kesme çıkarma onarımı, multiprotein komplekslerinden ziyade çeşitli DNA glikozilazlara bağlı substrat spesifikliği ile, NER ve yanlış eşleşme tamiri (*Mismatch Repair-MMR*)'nden ayrılmaktadır (77). Doksanlı yılların başında yapılan aktivite denemeleri ile 8-OH-Gua:C baz çiftini içeren çift zincirli DNA'ya spesifik bu

tip enzimlerin varlığı belirlenmiştir (78-80). *Escherichia coli*'de **formamidopirimidin glikozilaz (Fpg veya MutM)**, **endonükleaz III (Nth)** ve **endonükleaz VIII (Nei)** adındaki üç ayrı DNA glikozilaz, MutM, Nth ve Nei genlerinden kodlanmaktadır. İnsanda ise bu üç genle homolog olan DNA tamir genlerinin ekspresyonu ile oluşan sırasıyla **hOGG1**, **NTH** ve **NEIL1** olarak adlandırılan substrat spesifik glikozilazlar bulunmaktadır (81). Sitozin ile eşleşmiş 8-OH-Gua, çoğunlukla BER yolağını başlatan hOGG1 tarafından tanınır ve kesilerek uzaklaştırılır. BER'in ilk aşaması **DNA glikozilazlar** tarafından şeker artığı ve modifiye baz arasındaki N-glikozidik bağın hidrolize edilerek lezyonun uzaklaştırılması ve apürinik/aprimidinik(AP) bölgelerin oluşturulmasıdır (82). Memeli hücrelerinde yaklaşık 10 farklı DNA glikozilaz bulunmaktadır (83). Sadece glikozilaz aktivitesi gösteren tek fonksiyonlu glikozilazlar, DNA ürününe bağlı kalarak abazik bölgeyi olası zincir kırılmalarına karşı korurlar. 8-okzoguanin (8-hidroksiguanin) glikozilaz (OGG1), endonükleaz VIII benzeri protein (NEIL1) ve formamidoprimidin glikozilaz gibi iki fonksiyonlu glikozilazlar ise modifiye bazı uzaklaştırdıktan sonra AP liyaz aktivitesi gösterirler (84,85). Bu şekilde β - veya β,δ -eliminasyon reaksiyonları yoluyla DNA iskeletini 3'ucundan kırarak DNA'da tek zincir kırılmasına yol açarlar. Bu kırık, polimerizasyon ve ligasyon öncesinde temizlenmesi ve normal bir 3'hidroksil grubuna dönüştürülmesi gereken bir 3'- α,β -doymamış aldehid veya 3'-fosfat bulundurmaktadır (76,77). Memelilerde bu aşamadan sonra BER yolağında **apürinik endonükleaz 1 (APE1)** devreye girerek derhal abazik bölgeyi 5' ucundan kırar ve özellikle 3'- α,β -doymamış aldehid olmak üzere engelleyici 3' ucunu uzaklaştırır (86). BER iki alt yolak ile devam eder. Bu alt yolaklar, bunlara dahil olan enzimler ve uzaklaştırılan nükleotidlerin sayısına bağlı olarak farklıdır. **Kısa yolak (Short patch)**'da Pol- β ile yalnız bir nükleotid yerine konulur ve yeni sentezlenen DNA, DNA ligaz III/XRCC1 heterodimer ile kapatılır (87,88). **Uzun yolak (Long patch)**'da ise Pol β , PCNA, Fen 1 ve Ligaz 1'in uyumlu çalışması ile 2-13 arasında nükleotid DNA'ya eklenebilir (89,90) (**Şekil 2.11**).



Şekil 2.11 Baz eksizyon tamir yolağının şematik diyagramı (31)

2.3.2. Nükleotid Kesme-çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair-NER)

Nükleotid eksizyon tamiri DNA'nın radyasyon veya kimyasallara maruz kalması veya DNA'ya protein eklenmesi ile oluşmuş büyük lezyonların uzaklaştırılması için iş gören esas tamir sistemidir. Hasarlı bazlar eksizyon nükleaz adı verilen çoklu alt ünitelere sahip bir enzim sistemi tarafından uzaklaştırılır (91-94). Eksizyon nükleaz tüm basit tekli baz lezyonlarını da uzaklaştırabilmektedir. Geniş substrat aralığından dolayı NER, lezyonu oluşturan spesifik kimyasal grupları tanıyamaz, fakat fosfodiester iskeletinde hasar tarafından oluşturulan konformasyonları tanıyabildiği düşünülmektedir (95). Nükleotid kesme-çıkarma onarımının temel basamakları; a) hasarın tanınması, b) prokaryotlarda 12-13-nt oligomer , ökaryotlarda 24-32-nt oligomer oluşturulduğu kesip-çıkarma c) kesilen oligomerin salınması, d) oluşan boşluğun sentez ile doldurulması, e) ligasyon. İnsanlarda eksizyon tamiri 15 polipeptidden oluşan altı tamir faktörü (RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG ve XPF.ERCC1) tarafından gerçekleştirilir (96-98). Memeli hücrelerinde NER mekanizmasının spesifikite problemi, oldukça yüksek derecede seçiciliğin olduğu etkileşimlerde kullanılan iki temel mekanizma ile çözülür; **kooperatif bağlanma** ve **kinetik düzeltme** (Y99).

İnsanda eksizyon nükleaz kooperatif bağlanmayı ve kinetik düzeltmeyi biyolojik olarak kabul edilebilir bir oranda özgülük derecesi sağlamak için kullanır (100). NER mekanizmasında DNA hasarı, hasarlı bölgede rasgele bir araya gelen RPA, XPA ve XPC-TFIIH proteinlerinin kooperatif bağlanması sonucu tanınır. Dört tamir faktörü bağlanma bölgesinde bir kompleks oluştururlar ve eğer bağlanma bölgesi hasarsız ise kompleks XPB ve XPD helikazlar tarafından ATP hidrolizi yoluyla ayrılır (kinetik okuma). Eğer bölge hasar içeriyorsa lezyonun etrafındaki yaklaşık 25 baz çiftlik ikili sarmal ATP hidrolizi ile açılır ve hasarlı bölgede kararlı bir kompleks (*preincision complex 1-PCI1*) oluşturulur. Sonrasında XPC'nin yerini komplekste daha kararlı bir kompleks (*preincision complex 2-PCI2*) oluşturmak için XPG alır. Nihayetinde, XPF.ERCC1 hasarlı bölgede üçüncü bir kompleksi (*preincision complex 3- PIC3*) meydana getirmek için iş görür (101). Hasarlı DNA, hasarın 3' ucuna yaklaşık 6 baz uzaklıktaki fosfodiester bağında XPG ile , 5' ucuna yaklaşık 20 baz uzaklıktaki fosfodiester bağında ise XPF-ERCC1 ile kırılır. Sonuçta

oluşturulan 24-32 baz çiftlik oligomer salınır ve boşluk PCNA ve RFC replikasyon proteinlerinin de yardımıyla Polδ/• tarafından doldurulur (76).

2.4. OKSİDATİF DNA HASARI VE TÜMÖR OLUŞUMU

Hasarlanmış DNA nörodejeneratif hastalıklar, kardiovasküler bozukluklar ve yaşlanma gibi pek çok hastalığın yanısıra birçok kanser türünde de önemli rol oynamaktadır. Kanser patogenezi hücrel homeostazisin sağlanması için gerekli genlerdeki mutasyonları ve bu mutant hücrelerin klonal çoğalmasını sağlayan bir süreçtir (74). Başlangıç, ilerleme ve malignite oluşumunu içeren bu adımların hepsinde oksidatif mekanizmaların potansiyel rol aldığı gösterilmiştir (6).Yapılan çalışmaların çoğunda pek çok tümörde oksidatif DNA lezyonlarının seviyelerinde artış gözlenmesi, oksidatif olayların mutagenizden büyük oranda sorumlu olduğu ve bu tip hasarların kanser etiyolojisini etkilediğini desteklenmektedir (102,103). DNA bu hasar verici bileşiklerin etkileşime girdiği hücrel hedefler arasında en önemlilerinden biridir. Bu bileşikler daha çok guanin içeren bölgeler ile etkileşime girerler. Serbest radikallerin DNA'ya saldırması sonucu yaygın olarak ortaya çıkan 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) aynı zamanda memelilerde bir oksidatif hasar belirteçidir (104). Bu premutajenik lezyon DNA replikasyonu sırasında sitozinin yanı sıra adenin ile eşleşerek G:C→T:A transversiyonlarına neden olur (105). Bu tip mutasyonların insan akciğer ve karaciğer kanserlerinde *ras* onkogen ve p53 tümör baskılayıcı geninde artmış miktarlarda olduğu gözlenmiştir (105,106). 8-OH-Gua'nin maligniteyi artıran 5-OHMeUra gibi diğer lezyonları da artırdığı bilinmektedir (7). Bununla birlikte 8-OH-Gua'nin tek başına varlığı tümör oluşumuna gerekli ve yeterli koşul değildir. DNA modifikasyonları baz ve şeker düzeyinde değil kromozomal düzeyde de oluşabilirler (107). Reaktif oksijen türlerinin tümörün gelişimini etkilediği de gösterilmiştir (108). Yapılan çalışmaların çoğunda gelişimi tetikleyen kimyasalların hücrel ROT kaynaklarını aktif hale getirerek oksidatif stres oluşturduğu ve antioksidanların bu gelişimi engelleyebileceği savunulmaktadır (109). Akciğer kanserinin sigara içimi ile ilişkilendirildiği çalışmalarda oksidatif stresin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda arttığının gösterilmesi reaktif oksijen türlerinin kanserdeki potansiyel rolünü desteklemektedir (110-112). Sigara içimi akciğer kanserinin etyolojisi ile yakından ilişkilidir. Sigara içen ve içmeyen kişilerin akciğerlerinde ve akyuvarlarında yapılan çalışmalarda, sigara içenlerde serbest radikal oluşumunun arttığı, oksidatif

DNA hasarının yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (112-114). Ayrıca bu kişilerde 8-OH-Gua tamirinin arttığı bunun da 8-OH-dG ve 5-OHMeUra'in atılımına neden olduğu savunulmaktadır (115,116).

2.4.1. ROT'a bağlı mutasyonlar

Mutasyon spektrumu çalışmalarına bakıldığında oksidatif DNA hasarı dört farklı yolakla mutasyona yol açmaktadır (107). Birinci ve en basit mekanizma, DNA'da nükleotid artıklarında meydana gelen ve hidrojen bağlanması ve kodlama spesifitesinde değişikliklere yol açan kimyasal modifikasyonlardır (117,118). İkinci kalıp DNA üzerinde polimerazın spesifik olduğu önemli bölgelerin hasarıdır. Bu mekanizma DNA pol-β'nın iş gördüğü mutageneze en büyük sebeptir. Üçüncü mekanizmada ise, DNA'da hasarın oluşturduğu yapısal değişiklikler DNA polimerazın doğru bir şekilde replikasyon yapmasını engellemektedir (119). Diğer bir olası mekanizma ise, DNA polimerazın hataya yönelik olarak konformasyonunu artırmasıdır. Bunun nedeni, DNA polimerazın oksijen radikalleri ile hasara uğraması veya kalıp DNA'daki değişiklikler ile karşılaşması sonucu DNA polimerazda değişikliklerin meydana gelmesi olabilir (120-123).

DNA'da oksidatif hasara bağlı olarak en sık görülen lezyon olan **8-OH-Gua** tipik oksidatif stres belirteçlerinden biridir ve replikasyon öncesi tamir edilmezse GC→TA transversiyonlarına yol açmaktadır (124). *E.Coli'* de yapılan çalışmalarla bu lezyonun DNA polimerazda hatalı okumaya yol açtığı gösterilmiştir. Bu lezyonun yaptığı yanlış eşleşmelerden 8-OH-Gua:C çiftinin etkili bir şekilde tamir edildiği fakat 8-OH-Gua:A çiftinde tamirin zayıf kaldığı gösterilmiştir (125,126). Fizikokimyasal özellikleri bakımından bu lezyonun transkripsiyon ve replikasyonu etkilediği ve pek çok kanser türünde arttığı gözlenmektedir (127).

Guaninin hidroksil radikali ile yaptığı tek elektron oksidasyonunun ürünü olan **okzalon** potansiyel olarak G→T transversiyonları oluşturmakta ve polβ'in herhangi bir nükleotide girmesini engelleyerek replikasyonu durdurmaktadır (56). 8-OH-Gua gibi **8-OH-Ade** de DNA'da küçük yapısal değişikliklere yol açmaktadır (128). Bakteriye düzeyde önemsiz mutasyonlara sebep olmasına rağmen, memelilerde hem pol α hem pol β'nın dATP ve dGTP'i 8-OH-dA karşısına yanlış eşleştirdiği

görülmüştür. Bu lezyon 8-OH-dG ile karşılaştırıldığında en az dört kat daha az mutajeniktir (128-131).

Formamidopirimidinler, **FapyGua** ve **FapyAde** DNA'da hidroksil radikalının saldırısıyla oluşan ana ürünlerdendir. Guaninin metilasyonu sonucu meydana gelen 5-Me-FapyGua prokaryotlarda güçlü bir *in vitro* replikasyon engelidir (132).

Adenin veya timinle yanlış eşleşme yerine DNA'da zincir uzamasını durdurur. Bu da bu lezyonun mutajenik olmaktan çok letal olduğunu desteklemektedir (133,134).

DNA'daki **2-Hidroksiadenin (2-OH-Ade)** lezyonlarının çoğunluğu olasılıkla 2-OH-dATP'nin yanlış birleşmesinden ileri gelmektedir. Adenin C-2 pozisyonunda değişikliğe uğraması baz eşleşmesini etkilemektedir ve adenini içeren eşleşmedeki tüm mutasyonlar (A→G, A→T, A→C) 2-OH-Ade tarafından oluşturulmaktadır (135-138).

Primidin lezyonlarından **timin glikol (Tg)** DNA'nın ana oksidasyon veya iyonize radyasyon ürünlerinden biridir, öncelikle Ade ile eşleşir ve mutajenik olmaktan çok lezyondan bir baz önce ve sonra replikasyonu engellemektedir (117, 139).

5-formilsitozin (5-FoCyt) metillenmiş sitozine ROT'nin saldırısıyla oluşur (140-142).

5-FoCyt'nin C:G→A:T geçişlerini ve C:G →A:T transversiyonlarını tetiklediği bilinmektedir (143).

Sitozinin oksidasyon ürünleri olan **5-hidroksisitozin (5-OH-Cyt)**, **5-hidroksiurasil (5-OH-Ura)** ve **urasil glikol (Ug)**, *E.Coli*'de büyük oranda C→T geçişleri nedeniyle mutasyonlara neden olurlar (144-147).

5-Hidroksimetilurasil (5-OHMeUra) memelilerde büyük oranda delesyona neden olur. Bunun sebebi yanlış eşleşme veya birleşmeden çok 5-OHMeUra-DNA glikozilazın baz kesme çıkarma onarımı sırasında delesyonlara yol açmasıdır (148).

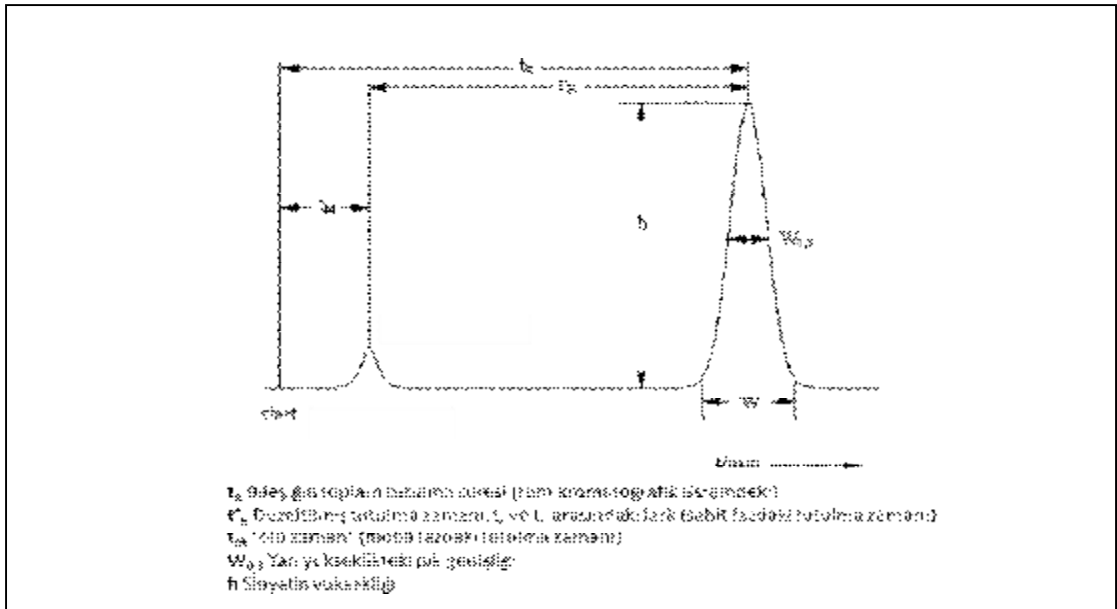
2.5. GAZ/SIVI KROMATOĞRAFI – KÜTLE SPEKTROMETRİ

Gaz kromatografi/Kütle spektrometrisi [*Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*] ve Sıvı kromatografi/Kütle spektrometrisi [*Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)*] adlarından da anlaşılacağı üzere iki

teknikğin birleştirilmesiyle oluşturulmuş kimyasal karışımların analizi için kullanılan yöntemlerdir. Kromatografi bir karışımı bileşenlerine ayırırken kütle spektrometrisi ayrılan bu bileşenleri karakterize eder. Böylece bu iki teknikin beraber kullanılmasıyla bir karışımın hem nitel hem de nicel değerlendirilmesi yapılabilir.

Kromatografi, taşıyıcı olan mobil faz ve sabit faz arasında seçici bir şekilde dağılan karışımı bileşenlerine ayırma yöntemidir (149). Gaz kromatografide taşıyıcı faz inert bir gaz (helyum, hidrojen veya nitrojen) iken sıvı kromatografide sıvı haldeki bir çözücüdür.

Kromatografide uzunluk, çap, film kalınlığı açısından boyutları ve fazı belli olan bir kolon kullanılır. Taşıyıcı faz içinde çözülmüş karışımın bu kolondan geçirilmesi ile ayırım sağlanır. Kolona enjekte edilen moleküller özelliklerine göre farklı zamanlarda kolonu terk ederler. Bu zaman her molekül için karakteristiktir ve tutulma zamanı (*retention time-rt*) olarak adlandırılır. Ayrılan moleküller bir detektör aracılığıyla tanınır ve alınan sinyallerden bir grafik oluşturulur. Bu grafiğe *kromatogram* adı verilir (150). Karışım içinde en büyük konsantrasyona sahip molekül en uzun sinyali verdiği için kromatogramdaki en yüksek pik bu kimyasal türe ait olur (**Şekil 2.12**).

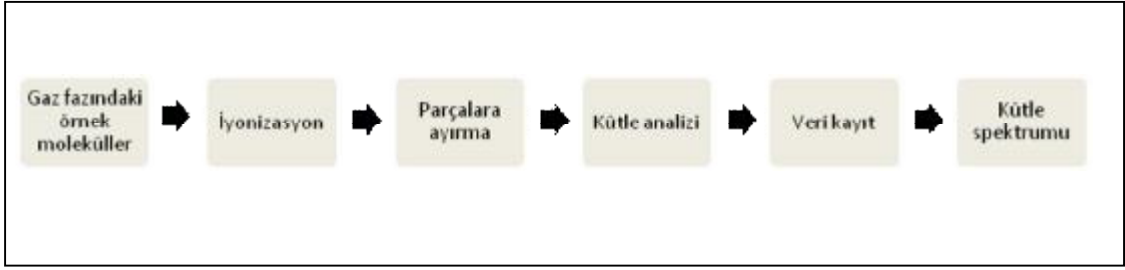


Şekil 2.12 Tipik bir gaz kromatogramı (151)

Derivatizasyon gaz kromatografisinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bir kimyasal bileşiğin türevleri olarak adlandırılan benzer kimyasal yapılara sahip ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, spesifik fonksiyonel bir grup derivatizasyon reaksiyonunda, reaksiyona giren bileşiği reaktivite, çözünürlük, kaynama noktası, erime noktası veya kimyasal kompozisyon açısından farklılaşmış türevlere dönüştürür (152). Kimyasal bileşiklere derivatizasyon ile uçuculuk gibi karakterlerin kazandırılması GC/MS analizlerinde bu tekniğin kullanılmasının en büyük sebebidir (153).

Sililasyon, oldukça yaygın olarak kullanılan bir derivatizasyon yöntemidir. Gaz kromatografisinde, ayırma esnasında problem yaratan tüm fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksilik asit, amin, tiyol, fosfat) silasyon reaktifleri ile derivatize edilebilirler. Sililasyon, bileşikteki asidik bir hidrojenin yerine $-SiMe_3$ gibi bir alkilsilil grubunun geçmesinden ibarettir. Oluşan ürünler genellikle daha az polar, daha uçucu ve termal olarak daha dayanıklıdır. Sililasyonda en yaygın olarak kullanılan kimyasallar trimetilsilil (TMS) reaktifleridir. Geniş çapta uygulanabilirlik ve kullanım kolaylığı sağlayan pek çok TMS reaktifi mevcuttur. En yaygın kullanılan TMS reaktiflerinin başında BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid), BSA (N,O-bis(trimetilsilil)asetamid) ve MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroasetamid) gelmektedir (154).

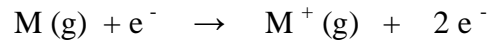
Moleküllerin farklı zamanlarda kolondan çıkması kütle spektrometresinin bu molekülleri ayrı ayrı yakalamasına, iyonlaştırmasına, hız kazandırmasına, yönünü değiştirmesine ve nihayetinde saptamasına izin verir. *Kütle spektrometresi*, bunu her bir molekülü iyonize parçalara ayırarak ve bu parçaların kütle/yük oranını (*mass to charge ratio-m/z*) kullanarak yapar. Genellikle bir kütle spektrometrik analiz aşağıdaki şu basamakları kapsar: (1) atomlaşma, (2) birinci basamakta oluşan atomların büyük bir kısmının iyon akımlarına dönüşümü (genellikle tek yüklü pozitif iyonlar), (3) ikinci basamakta oluşan iyonların kütle/yük oranlarına göre ayrılması ve (4) her tip iyonun kantitasyonu veya uygun bir dedektörle, örnekte çarpışma ile oluşturulan iyonların ürettiği iyon akımının ölçülmesi (155,156) (**Şekil 2.13**).



Şekil 2.13 Kütle spektrometri akış şeması

Kütle spektrometrisinde iyonlaşma üç farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Elektron-çarpışma iyonizasyonu (*electron-impact ionization-EI*) ve kimyasal iyonizasyon (*chemical ionization*) GC/MS'de kullanılırken, atmosferik basınç elektrosprey iyonizasyonu (*atmospheric pressure electrospray ionization-ESI*)'ndan LC/MS'de faydalanılmaktadır.

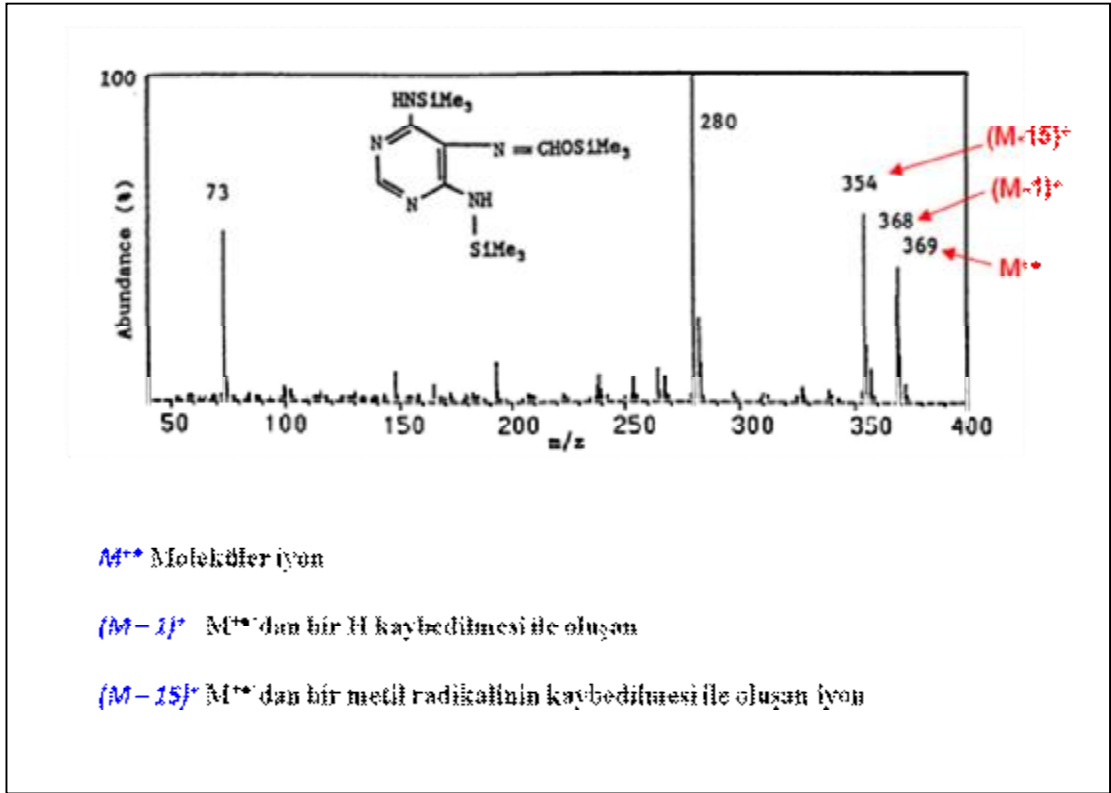
Elektron çarpışma iyonizasyonu, kütle spektrometride kullanılan en yaygın iyonlaştırma şeklidir. Bu yöntemde örnek kütle spektrometresinin iyon kaynağının içine gaz halinde gönderilir ve burada molekülü iyonlaştıracak kadar enerjiye sahip bir elektron demeti ile çarpıştır. Reaksiyon aşağıdaki gibi gösterilebilir:



Burada oluşan M^{+} moleküler iyonu aynı zamanda bir radikaldir ve kararsız yapısından dolayı parçalanma eğilimindedir.



Yukarıdaki reaksiyon sonucu yapısal olarak karakteristik ve saptanabilir parçalar oluşturulur ve kütle analizörü tarafından tanınır. Pek çok organik molekül için iyon verimi 70 eV civarında maksimum olduğundan EI'da molekülleri iyonize etmek ve parçalamak için bu düzeydeki elektron enerjisi kullanılır (157) (**Şekil 2.14**).

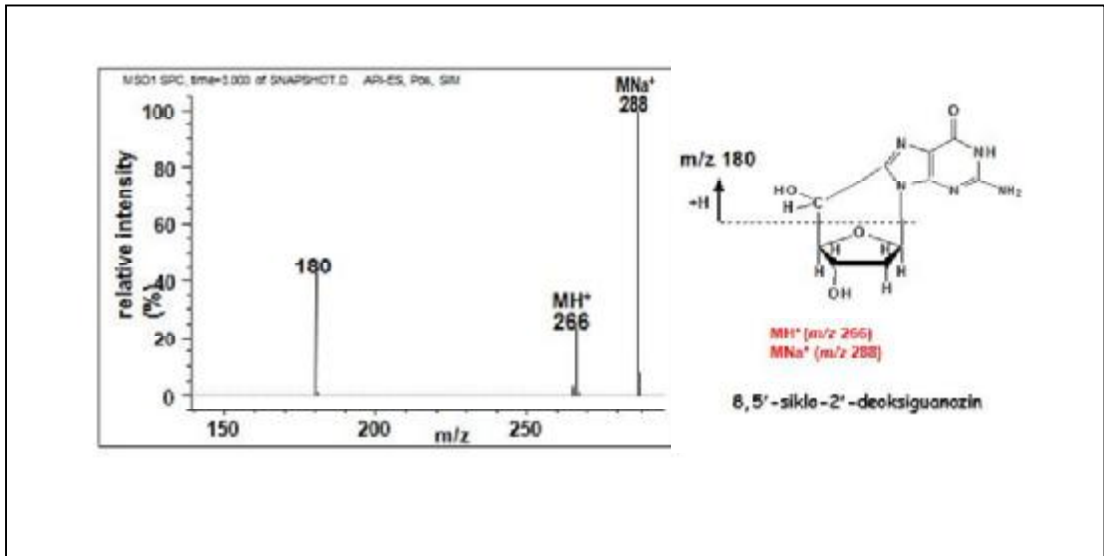


Şekil 2.14 4,6-diamino-5-formamidopirimidin'in trimetilsillil türevinin elektron çarpışma kütle spektrumu (158)

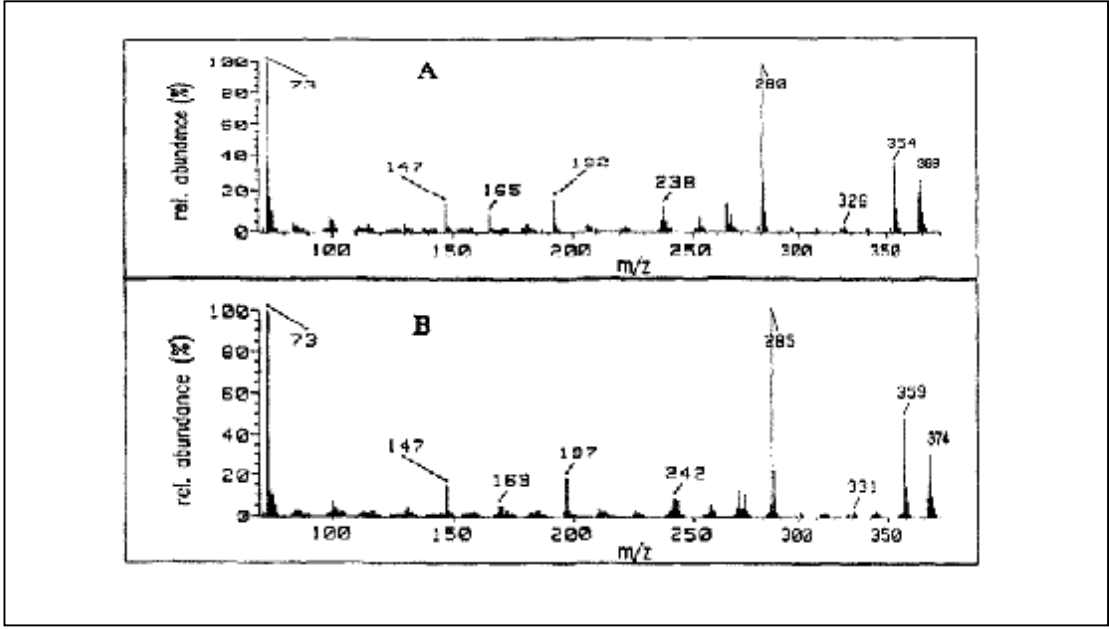
Elektrosprey iyonizasyon, sıvı fazdaki bileşiklere uygulanabilen, atmosferik basıncın kullanıldığı bir iyonlaştırma yöntemidir. Sıvı kromatografi ve kütle spektrometre arasında bir arayüz işlevi görerek bu iki yöntemi birleştirebilme özelliğinden dolayı LC/MS'de kullanılan birincil iyon kaynağıdır. ESI üç aşamadan oluşur: (1) zerrecik oluşumu, (2) zerreciklerin küçülmesi, (3) iyon oluşumu (158).

GC/MS ve LC/MS ile düşük konsantrasyonlarda DNA hasarının ölçülmesinde **seçilmiş iyon monitorizasyonu (Selected Ion Monitoring-SIM)** kullanılır. Bu yöntemle kompleks bir karışımda düşük konsantrasyonda olan bileşikler tanımlanır ve miktarları belirlenir. Bu yöntemin kullanılması için bileşiğin kütle spektrumunun ve kolonda alıkonma zamanının bilinmesi gerekir. Bileşiğin bir takım karakteristik iyonu bileşik GC veya LC kolonundan elue oldukça kütle spektrometresi tarafından eş zamanlı olarak görüntülenir. Eğer bileşik karışım içinde mevcutsa, uygun yoğunluktaki iyonların sinyalleri bilinen tutulma zamanlarında görüntülenir. Pozitif

tanımlama için görüntülenen iyonların sinyalleri ve yoğunlukları bileşiğin bilinen bir kütle spektrumu ile karşılaştırılır. Ayrıca bu yöntemde, analizden önce DNA örneğine uygun internal standartlar eklenerek kompleks karışımdaki bileşenlerin miktarı belirlenebilir. Bileşiğin izotop-işaretli kararlı bir analogu internal standart olarak kullanılır. Bu işleme **izotop-dilüsyonlu kütle spektrometri** (*isotope-dilution mass spectrometry-IDMS*) denir. Bu yöntemde, ilgili bileşik ile izotop-işaretli kararlı analogunun kütle spektrumunda parçalanma düzeni aynıdır. İşaretli analogların kütle spektrumunda pek çok iyonunun kütleleri, izotop içeriklerine göre daha yüksek kütle sinyali verirler (158,159) (Şekil 2.15, 2.16).

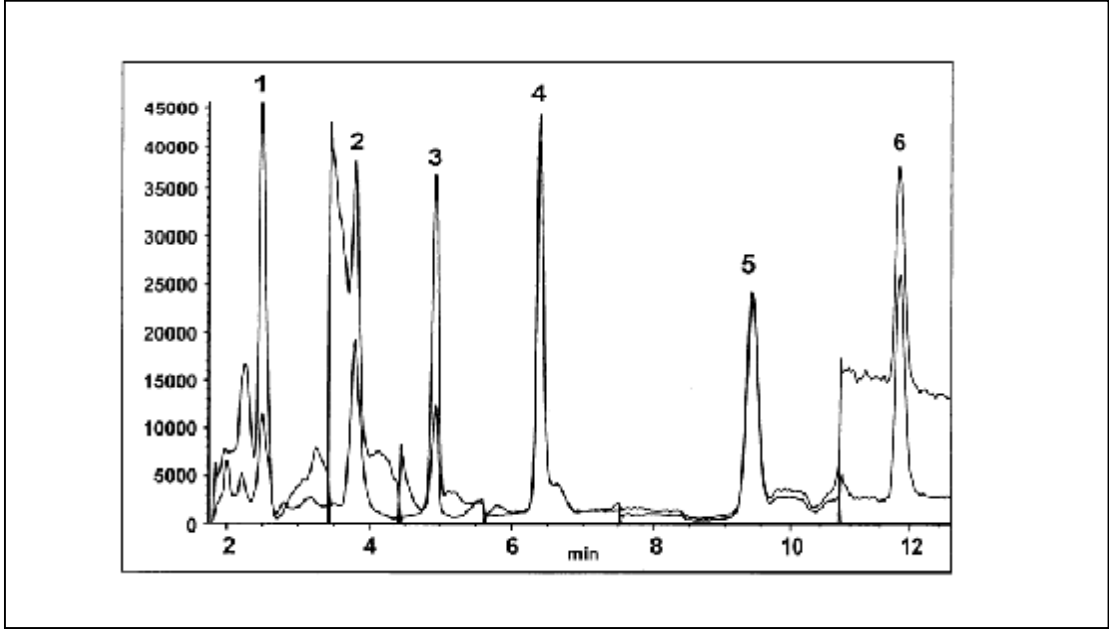


Şekil 2.15 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin'in kütle spektrumu (158)



Sekil 2.16 4,6-diamino-5-formamidoprimidin(Me_3Si)₃ ve 4,6-diamino-5-formamidoprimidin-¹⁵N₃,¹³C,²H (Me_3Si)₃'in EI-kütle spektrumları (45)

Modifiye DNA nükleozidlerinin LC/MS ile ayrılması ve tanımlanması, **Şekil 2.17**'de sunulmaktadır. Sinyaller modifiye nükleozidleri ve onların kararlı izotop-işaretli analoglarını göstermektedir¹⁶. Ayrıca şekilde, Pik 1: m/z 271 (yüksek sinyal, (5'R)-8,5'-cdGuo-¹⁵N₅'nin MH⁺ iyonu) ve m/z 266 (düşük sinyal, 5'R-8,5'-cdGuo'nin MH⁺ iyonu); Pik 2: m/z 250 (yüksek sinyal, (5'R)- 8,5'-cdAdo'nin MH⁺ iyonu) ve m/z 265 (düşük sinyal, (5'R)-8,5'-cdAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅'nin MH⁺ iyonu); Pik 3: m/z 271 (yüksek sinyal, (5'S)-8,5'- cdGuo-¹⁵N₅] ve m/z 266 (düşük sinyal, (5'S)-8,5'-cdGuo'nin MH⁺ iyonu); Pik 4: m/z 168 (yüksek sinyal, 8-OH-dGuo'nin BH₂⁺ iyonu ve m/z 170 (düşük sinyal, 8-OH-dGuo-¹⁸O'nin BH₂⁺ iyonu); Pik 5: m/z 250 (yüksek sinyal, (5'S)-8,5'-cdAdo'nin MH⁺ iyonu] ve m/z 265 (düşük sinyal, (5'S)-8,5'-cdAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅'nin MH⁺ iyonu); Pik 6: m/z 152 (yüksek sinyal 8-OH-dAdo 'nin BH₂⁺ iyonu) ve m/z 162 (düşük sinyal, 8-OH-dAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅'nin BH₂⁺ iyonu) şeklinde belirtilmektedir.



Şekil 2.17 DNA nükleozidlerinin LC/MS ile ayrılması ve tanımlanması (31)

Karışım içerisindeki bileşiğin miktarı, karakteristik iyonların ve onların işaretli analoglarının oluşturdukları sinyal alanlarının ölçülmesi ile hesaplanır. Bileşiğin miktarı ile karakteristik iyonunun sinyal alanı arasındaki ilişki Şekil 2.18'deki gibidir:

$$\begin{array}{l}
 \text{Bileşiğin miktarı} = \text{Faktör } a \times \text{iyonun verdiği sinyal alanı} \\
 \text{Analoğun (standart) miktarı} = \text{Faktör (std)} \times \text{iyonun (std) verdiği sinyal alanı} \\
 \hline
 \frac{\text{Bileşiğin miktarı}}{\text{Analoğun (standart) miktarı}} = \frac{\text{Faktör } a}{\text{Faktör (std)}} \times \frac{\text{iyonun verdiği sinyal alanı}}{\text{iyonun (std) verdiği sinyal alanı}}
 \end{array}$$

Şekil 2.18 Bileşik miktarı ile iyon-akım profilindeki sinyal alanı arasındaki ilişki

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	Marka
Tris Tamponu	Sigma 252859
EDTA	Sigma ED2P
Sodyum Klorür	Sigma S-3014
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma L-4390
Sodyum Hidroksit	Sigma S-5881
Asetik Asit	Sigma 242853
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	BiochromAG L-1820
Proteinaz K	Sigma P-2308
BSTFA	Sigma 15222
Susuz Piridin	Sigma 270970

3.1.2. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka/Yöntem	Model	Üretici Firma
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Almanya
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research	Eppendorf, USA
Derin dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Electron Co, USA
Spektrofotometre	Varian	Carry 50	Varian, USA
pH metre	Orion	Model 420	Orion, USA
Freeze-Dryer (Liyofilizatör)	Flexi-Dry	Flexi-Dry MP	SP Industries Inc, USA
GC/MS	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD	-	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD
LC/MS	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD	-	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD
Yüksek çözünürlüklü erimiş-silika kapiler kolon	Agilent Technologies	HP-Ultra2,i.d. 0.2mm, film kalınlığında, 0.33µm	Agilent Technologies, Inc., Rockville, MD
SpeedVac	SpeedVac	SC210A SpeedVac Plus ve RVT 4104 soğutulmuş buhar tuzağı	Thermo- Savant, Holbrook, NY

3.2. OLGU SEÇİMİ VE MATERYAL ELDESİ

3.2.1. Materyal eldesi

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Göğüs Cerrahisi AD'da akciğer kanseri nedeniyle cerrahi rezeksiyon geçiren, değişik yaş gruplarındaki hastalarda gerçekleştirildi. Bu çalışma, DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2007.KB.SAG.67 nolu ve 'Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde DNA Hasarı ve Tamir Mekanizmaları' isimli proje ile desteklendi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 05.10.2007/354 tarih ve sayılı kararı ile ise çalışmanın uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığı belirtildi (EK 1). Her grubu oluşturan bireyler ile projenin amacı ve kapsamını açıklayıcı bilgilendirme görüşmesi yapıldı ve aydınlatılmış onam belgesi alındı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, mesleği, yandaş hastalıkları, sigara içme durumları, almakta oldukları tedavileri olgu kayıt formu doldurularak kaydedildi. Hastaların araştırmaya dahil olma ve dışlama kriterleri aşağıdaki gibidir;

Çalışmaya alma kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etme.
2. Akciğer kanseri tanısının histopatolojik olarak konulması
3. Akciğer kanseri nedeniyle yapılacak cerrahi operasyona medikal ve solunum fonksiyonları açısından uygunluk
4. Akciğer kanseri nedeniyle tanı veya tedavi (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) amacıyla cerrahi operasyon endikasyonu olması
5. 18 yaş üzeri olgular
6. Tam olarak evreleme yapılmış olması

Çalışmadan dışlama kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etmeme
2. 18 yaş altı olgular
3. Medikal inoperabilite (ileri derece düşünlük ve çok ileri yaş, solunum fonksiyonlarının ileri derece bozukluğu)
4. Tam olarak evrenmemiş olgular

5. Kanser dışı nedenlerle yapılmış cerrahi operasyon
6. Histopatolojik olarak akciğer kanseri kesin tanısının olmaması

Bir yıllık dönem içinde operasyon yapılan, 29 olgu çalışmaya dahil edildi. Rezeksiyon sırasında alınan tümör dokuları (patolojik dokular) çalışma grubunu, çevredeki (normal) dokular ise kontrol grubunu oluşturdu. Tümör dokuları patolojik olarak incelendi ve uzman patolog tarafından KHOAK olduğu kesinleştirildi. Kontrol dokuları, operasyon sırasında cerrahın makroskopik analizi sonucu, tümör dokusundan en az 5-6 cm uzaklıkta olacak şekilde aynı lobdan alındı.

3.2.2. Örneklerin toplanması ve saklanması

Dokular Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi AB. Öğretim üyeleri tarafından alındıktan sonra soğuk serum fizyolojik içinde hızla Biyokimya AD'a getirildi. Burada yaklaşık 0,2 g'lık parçalara ayrılarak mikrosantrifüj tüpleri içerisinde DNA izolasyonunun gerçekleşeceği güne kadar -80 °C' de saklandı.

3.2.3. DNA izolasyonu

Dokulardan DNA izolasyonu DEÜTF Biyokimya AD ve ARLAB'da gerçekleştirildi. Dokular saklanmış oldukları -80 °C'lik dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz içerisinde çözünmesi sağlandı. Önce bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra yine buz içerisinde homojenize edildi. DNA, homojenize edilen dokulardan, NaCl metodu ile aşağıdaki gibi izole edildi:

- Homojenize edilen dokular 15 mL'lik polipropilen santrifüj tüpleri içerisinde 4 mL liziz tamponu (0.5M Tris pH:8, 20mM EDTA pH:8, 10mM NaCl, %1'lik sodyum dodesil sülfat, 0.5 mg/mL proteinaz K) ile 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün lizatın üzerine 2 mL doymuş NaCl çözeltisi eklendi.
- 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

- Örnekler oda sıcaklığında, 5000 g'de, 30 dakika santrifüj edildikten sonra DNA'yı içeren supernatan yeni 15 mL'lik polipropilen tüplere protein artıklarını almaktan kaçınarak transfer edildi.
- Supernatanın üzerine hacminin iki katı kadar soğuk etanol konuldu ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın görünür hale gelmesi beklendi.
- DNA santrifüj yardımıyla toplandı.
- DNA pelletlerinin 500µL saf su içerisinde tekrar süspansiyon haline gelmeleri için +4 °C'de 48 saat bekletildi.
- Çözünen DNA, yaklaşık 1/20 oranında seyreltildikten sonra 200-350 nm dalga boyu arasında spektral analizi yapıldı ve 340 ile 350 nm'lerdeki absorptans değerleri ile düzeltme yapıldıktan sonra 258 nm'deki absorptans kullanılarak ($ABS_{258} \times 50 \times \text{Dilüsyon Faktörü} = \dots \mu\text{g/mL}$) kantite edildi.
- DNA varlığı kesinleşen örnekler analizlerinin yapılacağı güne kadar -30 °C'da saklandı (160).

3.2.4. Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçüm Yöntemi

3.2.4.1. Örneklerin analize hazırlanması

DNA örneklerinde sıvı kromatografi ve kütle spektrometri ölçümü *DNA Measurement Laboratory, Biochemical Science Division, Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology-NIST, (Gaithersburg, Maryland, U.S.A)*'de gerçekleştirildi. Örnekler analize aşağıdaki gibi hazırlandı:

- Etanol (%70) içerisinde laboratuvara getirilen örnekler burada tekrar taze etanol (%70) ile iki kez yıkandıktan sonra santrifüj edildi.
- Etanolün uzaklaştırılmasından sonra pelletler *Speed Vac*'da vakum altında kurutuldu, ardından 500 µl su içinde 24 saat +4 °C'de çözünmeye bırakıldı.

- Her bir DNA örneğinin, kalitesinden emin olmak ve DNA konsantrasyonunu doğru olarak belirlemek için absorpsiyon spektrofotometresinde 200 ile 350 nm dalga boyları arasında UV spektrumu alındı.

- Dalga boyu 260 nm'deki absorbans, her bir örnekteki DNA konsantrasyonunun ölçümü için kullanıldı (1 absorbans = 50 µg DNA/mL).

- DNA örneği (50 µg) üzerine internal standartlar (50 µg) eklendikten sonra karışım *Speed Vac* ile vakum altında kurutuldu.

Eklenen internal standartlar aşağıdaki gibidir:

(5'R)-8,5'-cdGuo-¹⁵N₅ = (150X) 1 µL

(5'S)-8,5'-cdGuo-¹⁵N₅ = (1200X) 4 µL

8-OH-dGuo-¹⁵N₅ = (50X) 3 µL

(5'R)-8,5'-cdAdo-¹⁵N₅ = (200X) 1 µL

(5'S)-8,5'-cdAdo-¹⁵N₅ = (200X) 0.5 µL

8-OH-dAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅ = (250X) 1 µL

- Kurutulan örnekler 50 µL, 10 mM TRIS, pH 7.5 + 1/40 oranında 45 mM ZnCl₂ içeren 1 M sodyum asetat karışımında yeniden çözüldü.

- Daha sonra nükleaz P1 (3U=3µL) , yılan zehiri fosfodiesterazı (0.002U=2µL) ve alkalin fosfat (16U= 1µL) ile 24 saat 37 °C'de hidroliz edildi.

- Ependorf filtrelerine koyulan örnekler 8000xg'de 30 dakika santrifüj edildi.

- Filtrat sıvı enjeksiyon ampullerine transfer edildi.

- Örnekler LC/MS'de analiz edildi (161)

3.2.4.2. DNA örneklerinin LC/MS ile analizi

- İzotop dilüsyonlu sıvı kromatografi / kütle spektrometrisi ile DNA örneklerinde, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), 8-hidroksi-2'-deoksiadenozin (8-OH-dA) ve 5' (S)-8,5' siklo-2'-deoksiadenozin [(5'S)-cdA], 5' R-8,5' siklo-2'-deoksiadenozin [(5'R)-cdA], 5'(S)-8,5' siklo-2'-deoksiguanozin [(5'S)-cdG], ve 5'(R)-8,5' siklo-2'-deoksiguanozin [(5'R)-cdG], bileşikleri belirlendi (162,163,164).
- 8-OH-dG'nin stabil izotop işaretli analogu olan 8-OH-dG-¹⁵N₅ (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA) internal standart olarak kullanıldı. Internal standart olarak kullanılacak olan 8-OH-dG, 8-OH-dA, (5' S)-cdA, (5'R)-cdA, (5'S)-cdG, (5'R)-cdG'nin sırasıyla izotop işaretli stabil analogları olan 8-OH-dGuo-¹⁵N₅, 8-OH-dAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅, (5'S)-8,5'-cdAdo-¹⁵N₅, (5'R)-8,5'-cdAdo-¹⁵N₅, (5'S)-8,5'-cdGuo-¹⁵N₅, (5'R)-8,5'-cdGuo-¹⁵N₅ bileşikleri hazırlandı (161,165).
- Atmosferik basınç iyonizasyon-elektrosprey (API-ES) işlemi pozitif iyonizasyon modunda kullanıldı.
- Kurutucu gaz olan azotun akış hızı ve sıcaklığı sırasıyla 101/dak ve 350 °C olarak ayarlandı.
- Püskürtülen gazın basıncı 172 kPa ve kapiler potansiyel 4000 V idi.
- Parçalayıcının potansiyeli optimum koşullar sağlanıncaya kadar 60-120 V arasında değiştirildi.
- Elektron çoğaltıcısının potansiyeli 2600 V'da tutuldu. Kuadripolün sıcaklığı 99 °C'ye ayarlandı.
- Kolon olarak Ultra IBD C18-ters-faz (reversed-phase) (25 cm x 2.1 mm i.d., partikül boyut= 5µm) kolonu kullanıldı.
- Aynı sabit faz ile paketlenmiş destek kolonu (1 cm x 2.1 mm i.d.) kolonun başına eklendi.
- Çözücü A ve B sırasıyla su ve asetonitril idi. Dakikada bir B çözücüsünün % 0.5'lik gradyenti kullanıldı.

- Akış hızı 0.2 mL/dak, kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlandı. Her analiz için hidrolize DNA'nın 2-10 µL'lik bir bölümü kolona enjekte edildi (163).

- Modifiye nükleozidler ve onların izotop işaretli kararlı analoglarındaki karakteristik iyonların (8-OH-dG (m/z 168 ve 306), 8-OH-dG-¹⁵N₅ (m/z 173 ve 311), 8-OH-dA (m/z 152 ve 290), 8-OH-dA-¹⁵N₅ (m/z 157 ve 295), S-cdA (m/z 164 ve 250) ve S-cdA-¹⁵N₅, (m/z 169 ve 255) tanınmasında, belirleme ve miktar tayini için uygun alıkonma zamanlarında seçilmiş iyon monitorizasyonu-SIM kullanıldı (162,163,164).

3.2.5. Gaz Kromatografi ve Kütle Spektrometrisi ile DNA Baz Hasarı Ölçüm Yöntemi

3.2.5.1. Örneklerin analize hazırlanması

DNA örneklerinde gaz kromatografi ve kütle spektrometri ölçümü *DNA Measurement Laboratory, Biochemical Science Division, Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology-NIST, (Gaithersburg, Maryland, U.S.A)*' de aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidoprimidin (FapyGua) ve 4,6-diamino-5-formamidoprimidin (FapyAde) izotop dilüsyonlu gaz kromatografi/kütle spektrometri (GC/MS) ile saptanarak miktarı belirlendi.

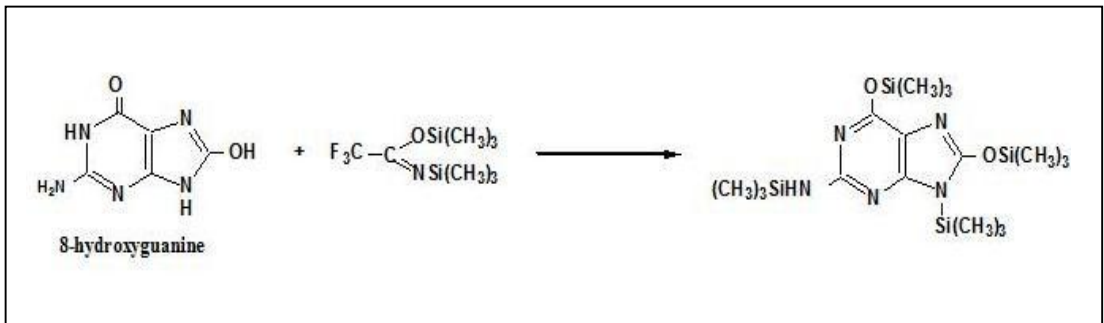
- Ölçüm öncesinde DNA örnekleri (50 µg) ve internal standartlar olan Fapy Gua- ¹³C, ¹⁵ N₂ ve FapyAde-¹³C, ¹⁵ N₂ (50 µg), 50 µL Fpg/Nth tampon (50 mM Na₂HPO₂-pH7.4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA ve 0.1 mM ditiyotritol) içerisinde 30 dakika çözülmeye bırakıldı.

- Ardından DNA 2 µg *E.coli* Fpg proteini ile 37 °C'de 30 dakika hidroliz edilerek FapyGua ve FapyAde bileşikleri serbestleştirildi.

- Fpg literatürde tanımlandığı gibi izole edildi (30).

- İnkübasyon sonrası reaksiyonun durdurulması için 150µL soğuk susuz etanol eklendi. -20 °C'de 60 dakika inkübe edildi.

- Dondurucudan alınan örnekler +4 °C'de 30 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant cam ampullere aktarıldı.
- Etanolün uzaklaşması için *Speed Vac*' da vakum altında kurutuldu.
- Kuruyan örneklerin üzerine 200 µL saf su eklendi.
- Ampullerin üzeri kağıt bez ile kapatılarak paket lastiği ile sabitlendi.
- Örnekler sıvı azot yardımıyla dondurulduktan sonra gece boyunca liyofilize edildi.
- İkinci gün derivatizasyon gerçekleştirildi (**Şekil 3.1**).
- Bu işlem için Fpg hidrolizinden sonra liyofilize edilmiş süpernatant fraksiyonlarının üzerine çeker ocak altında 30 µL BSTFA (% 1, v/v) ve 30 µL piridin (1:1, v/v) eklendi.
- Örneklerin üzerinden azot gazı geçirildi ve kapakları kapatıldı. 120°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra soğutulan örnekler Hamilton enjektörü ile kapakları açılmadan alınarak enjeksiyon ampullerine aktarıldı.
- Bu ampullerin de ağzı sıkıca mühürlendikten sonra GC/MS cihazına yüklendi (30,166).



Şekil 3.1 DNA okside bazının trimetilsilyon ile derivatizasyonu (158)

3.2.5.2. DNA örneklerinin GC/MS ile analizi

§ Belirleme ve miktar tayini için seçilmiş iyon monitorizasyonu, trimetilsilylenmiş 8-OH-Gua, FapyGua, FapyAde ve onların izotop işaretli kararlı analoglarındaki karakteristik iyonların [FapyAde (m/z 354, 368, ve 369), FapyAde-¹³C,¹⁵N₂ (m/z 357, 371, ve 372), FapyGua (m/z 442 ve 457), ve FapyGua-¹³C,¹⁵N₂ (m/z 445 ve 460)] tanınmasında kullanıldı (45).

§ FapyGua ve FapyAde'nin stabil izotop-işaretli analogları, Fapy Gua-¹³C, ¹⁵N₂ ve FapyAde-¹³C, ¹⁵N₂ *Cambridge Isotope Laboratory (Cambridge, MA, USA)*'dan satın alındı.

§ Analizlerde yüksek çözünürlükte erimiş-silika kapiler kolonu kullanılırken, % 5 çapraz bağlı fenilmetilsilikon sabit faz, aşırı saflıktaki helyum gazı ise taşıyıcı faz olarak kullanıldı.

§ Enjeksiyon portu ve GC/MS arayüzü sırasıyla 250 ve 280 °C'de tutuldu. Kolon çıkışı basıncı ise 65 kPa olarak ayarlandı.

§ Derivatize edilmiş örneklerin 4 µL'si otomatik enjektör ile GC kolonuna enjekte edildi.

§ Bölünme modu olarak genellikle 1:10 bölünme oranı kullanıldı.

§ Bölünme oranı elektronik olarak ayarlandı.

§ Kütle spektrometresi ile yapılan analizler EI-modunda 70 eV'da gerçekleştirildi.

§ Gaz kromatografisinin fırın sıcaklığı 130 °C'den 280 °C'ya (ilk iki dakika 130 °C'de, sonrasında 8 °C/min hızla artacak şekilde) ayarlandı.

§ Tanımlama ve miktar belirleme için karakteristik iyonların belirlenmesinde SIM kullanıldı.

§ Gözlenen bileşiklerin düzeyinin belirlenmesi için bu bileşiklerin iyonlarının verdiği sinyallerin alanlarının integrasyonundan faydalandı (Y166) (Bölüm 2, Sayfa 33, Şekil 17,18).

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hasta ve kontrol grubu verileri arasında yapılacak olan karşılaştırmalar, bağımsız non-parametrik Mann-Whitney U ve bağımlı non-parametrik Wilcoxon testi

ile gerçekleştirildi. Sigara içme durumuna, yaşa ve hastalığın evresine göre ayrılan gruplar arasında, oksidatif DNA hasar düzeyleri açısından anlamlı fark olup olmadığı non-parametrik Kruskal Wallis testi kullanılarak belirlendi. Testlerdeki tüm hesaplamalar için SPSS-Microsoft Windows 6.0 yazılımı (SPSS Inc, Chicago, IL) kullanıldı. İstatistiksel olarak iki yönlü P değeri < 0.05 ise anlamlı olarak değerlendirildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. SONUÇLAR

4.1. ÇALIŞMA OLGULARININ ÖZELLİKLERİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Göğüs Cerrahisi AD'da akciğer kanseri nedeniyle cerrahi rezeksiyon geçiren, değişik yaş gruplarından 32 hasta çalışmaya dahil edildi. Toplamda 29 normal ve 29 patolojik doku DNA izolasyonunda kullanıldı. Kontrol grubunda 28, hasta grubunda 26 örnekten DNA izolasyonu gerçekleştirilebildi. Çalışılmayan diğer dört örnekten ya yeterli düzeyde DNA elde edilemedi ya da yolda kaybedildi. Çalışmaya katılan olguların özellikleri Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmektedir.

Tablo 4.1 Çalışma olgularının yaş, sigara içme durumu ve sigara maruziyeti gibi özellikleri.

Hasta no	Yaş	Sigara İçme Durumu	Sigara Maruziyeti (paket/yıl)
1	65	±	20
2	61	±	100
3	63	+	55
4	43	±	20
5	64	+	60
6	61	+	90
7	73	±	45
8	62	±	40
9	50	±	30
10	63	±	15
11	59	+	60
12	81	±	50
13	70	-	0

14	80	±	40
15	65	±	50
16	71	+	83
17	43	+	25
18	56	±	45
19	49	+	30
20	69	±	55
21	75	±	45
22	65	±	20
23	59	±	40
24	73	±	100
25	71	±	50
26	66	±	100
27	55	±	30
28	74	-	0
29	68	+	52

(-) : Hiç sigara içmeyen; (+) : Sigara içiyor; (±) : Sigarayı Bırakmış

Tablo 4.2 Çalışma olgularının tümör dokularının klinik ve patolojik evreleri

Hasta No	Klinik Evre	Patolojik Evre
1	T ₁ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
2	T ₁ N ₀ M ₀	T ₁ N ₀
3	T ₃ N ₁ M ₀	T ₃ N ₁
4	T ₃ N ₀ M ₀	T ₃ N ₀
5	T ₁ N ₁ M ₀	T ₂ N ₀
6	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
7	T ₂ N ₂ M ₀	T ₃ N ₁
8	T ₃ N ₁ M ₀	T ₁ N ₁
9	T ₃ N ₁ M ₀	BENIGN
10	T ₄ N ₀ M ₀	T ₄ N ₀
11	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
12	T ₁ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
13	T ₁ N ₀ M ₀	T ₁ N ₀
14	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
15	T ₂ N ₂ M ₀	T ₂ N ₂
16	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀

17	T ₄ N ₀ M ₀	T ₂ N ₁
18	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
19	T ₄ N ₀ M ₀	T ₃ N ₁
20	T ₂ N ₂ M ₀	T ₂ N ₂
21	T ₁ N ₀ M ₀	T ₁ N ₀
22	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
23	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
24	T ₂ N ₁ M ₀	T ₂ N ₁
25	T ₂ N ₂ M ₀	T ₂ N ₀
26	T ₃ N ₀ M ₀	T ₂ N ₁
27	T ₂ N ₀ M ₀	T ₂ N ₀
28	T ₂ N ₀ M ₁	T ₂ N ₀
29	T ₁ N ₁ M ₀	T ₂ N ₁

Tablo 4.3 Çalışma olgularının tümör dokularının patoloji sonuçları

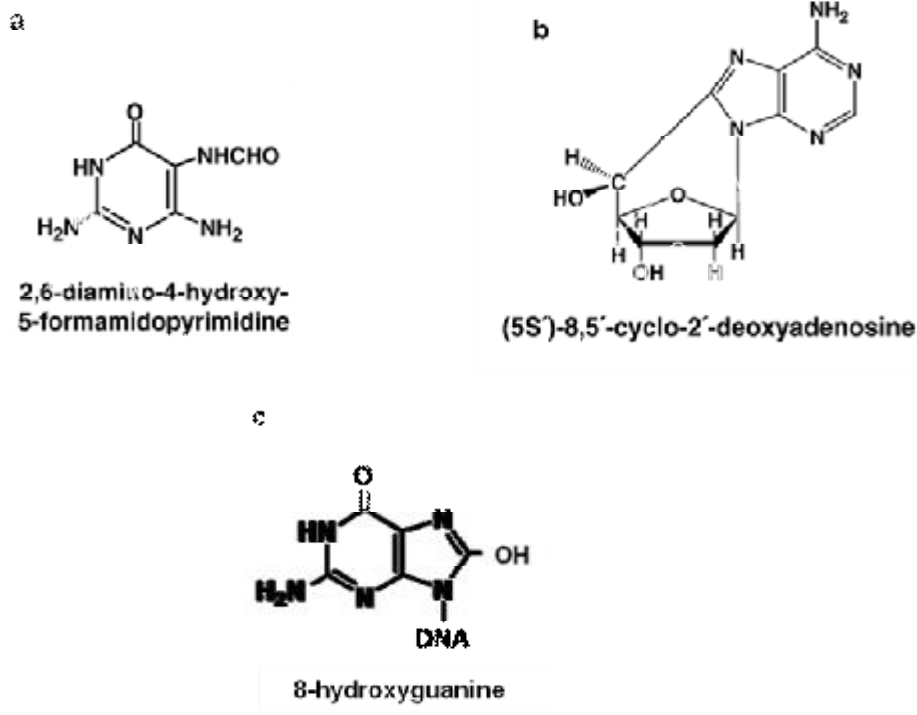
PATOLOJİ SONUCU	ADENOSKUAMÖZ KARSİNOM	ADENO KARSİNOM	SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM	BÜYÜK HÜCRELİ	TANIMSIZ
HASTA SAYISI	1	13	8	1	6

4.2 ÇALIŞMADA ANALİZİ YAPILAN LEZYONLAR VE BUNLARA İLİŞKİN BULGULAR

Mevcut çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda karakteristik oksidatif DNA lezyonları incelendi. Özellikle bu lezyonların kanserin evresi, yaş ve sigara maruziyeti ile ilişkisi araştırıldı.

Buna göre dokulardan izole edilen DNA Bölüm 3’de ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi enzimatik yolla nükleozidlerine ayrıldı ve S-cd-A lezyonlarının ölçümü LC/MS ile yapıldı. 8-OH-Gua, 8-OH-Ade, FapyAde ve FapyGua ölçümleri ise, DNA’nın *E.Coli*’den izole edilen Fpg enzimi ile hidrolize edilmesinden sonra izotop dilüsyonlu GC/MS ile gerçekleştirildi. Söz konusu bileşikler DNA’daki pürin

bazlarının OH ile reaksiyonu sonucu oluşan tipik ürünlerdir. Bu bileşiklerin oluşma mekanizmalarına Bölüm 2’de ayrıntılı bir şekilde değinilmektedir. Yapıları ise **Şekil 4.1**’deki gibidir.

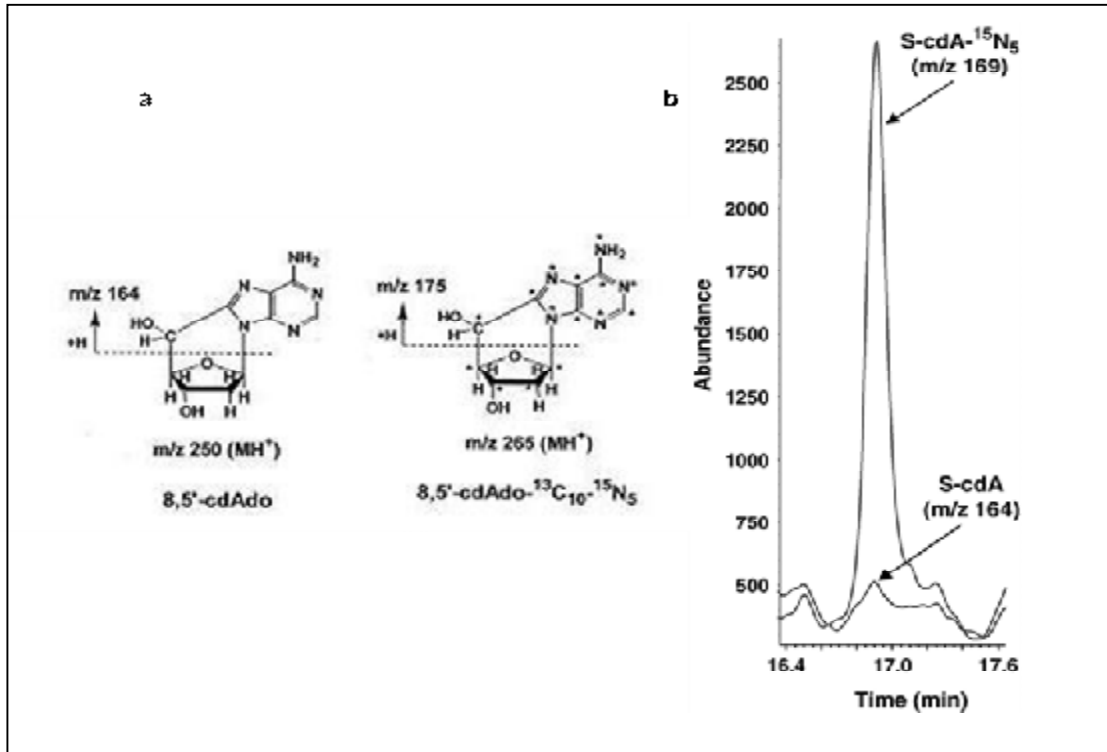


Şekil 4.1 Çalışmada analizi yapılan lezyonların kimyasal yapıları, FapyGua (a), S-cdA (b), 8-OH-Gua (c).

Bu lezyonların düzeylerinin belirlenmesi ise gözlenen iyonların sinyallerinin integrasyonu ile gerçekleştirildi. Lezyonların DNA üzerindeki düzeyleri enzimatik hidroliz öncesi bilinen miktarlarda eklenen internal standartlar kullanılarak hesaplandı. Lezyon düzeylerinin LC/MS ile tayini örneklerin cihaza üç kez yüklenmesi sonrasında elde edilen sinyallerin alanlarının yine üç farklı proje çalışmanı tarafından integrasyonu sonucu elde edilen sayıların ortalaması alınarak gerçekleştirildi. Hesaplamalarda kullanılan formül sayfa 32 Şekil 2.18’de belirtilmiştir.

4.2.1. LC/MS ile tanımlanan lezyonlar

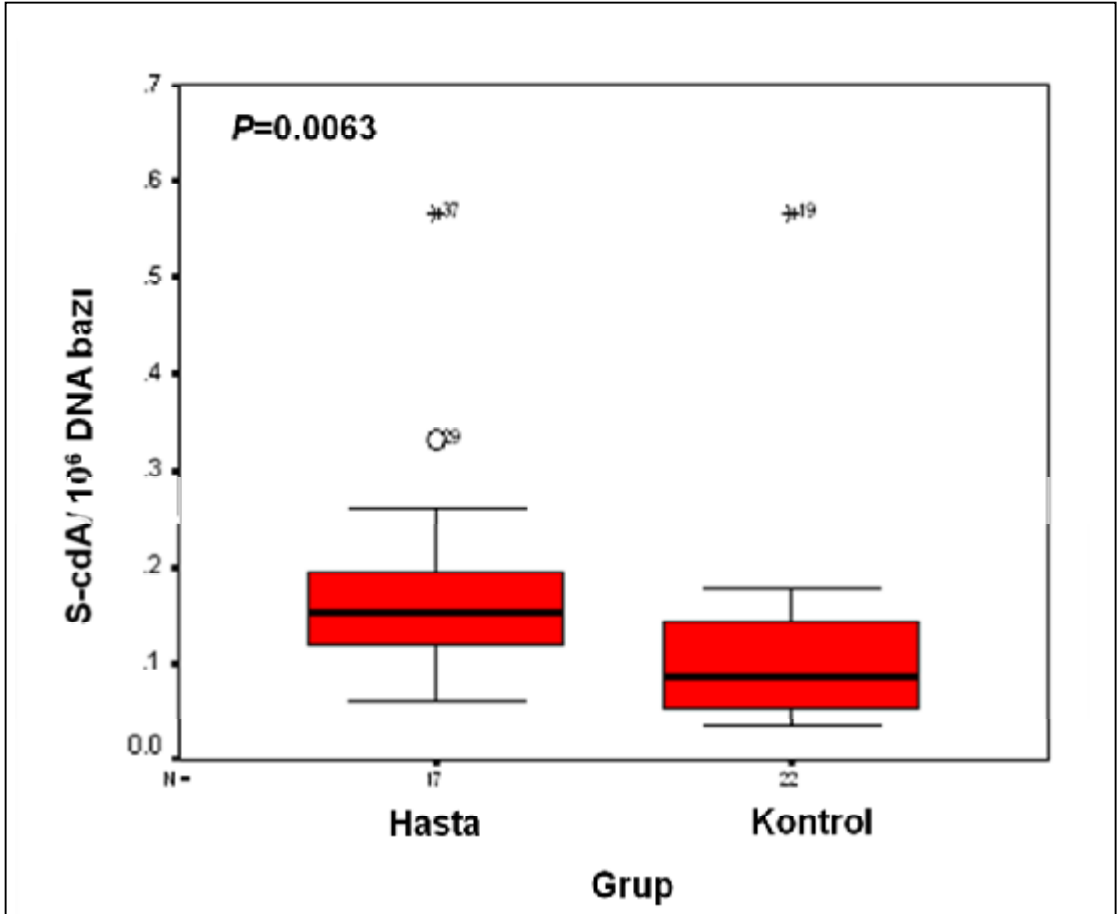
Analizlerde LC/MS ile okside lezyonların ölçümlerine örnek olarak S-cd-A bileşiği ve bu bileşiğin izotop işaretli analogunun karakteristik iyonlarından elde edilen iyon-akım profili ve parçalanma modeli **Şekil 4.2**'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2 8'5-cdAdo'nun parçalanma yolları (a), DNA örneğinin enzimatik hidrolizatının SIM ile LC/MS analizi sırasında elde edilen iyonlarının m/z 164 (S-cdA'nın bir iyon fragmanı) ve m/z 169'da (S-cdA-¹⁵N₅'in bir iyon fragmanı) iyon-akım profilleri (b) (8'5-cdAdo-¹³C₁₀-¹⁵N₅'de işaretlenmiş atomlar yıldız ile gösterilmektedir).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastanın tümör (n=17) ve akciğer sağlıklı dokularından (n=22) izole edilen DNA örneklerinde LC/MS ile analiz edilen S-cd-A'nın düzeyinin patolojik dokularda sağlıklı dokulara göre istatistiksel anlamda artmış olduğu bulundu ($p=0.0063$). **Şekil 4.3**'de gösterilen 'box-plot' grafiğinde kutu bölgesi dikey ekseninde medyanı belirtilen veri setinin çeyrek değerler genişliğini göstermektedir. En yüksek ve en düşük veri değerleri grafikteki kutunun sırasıyla

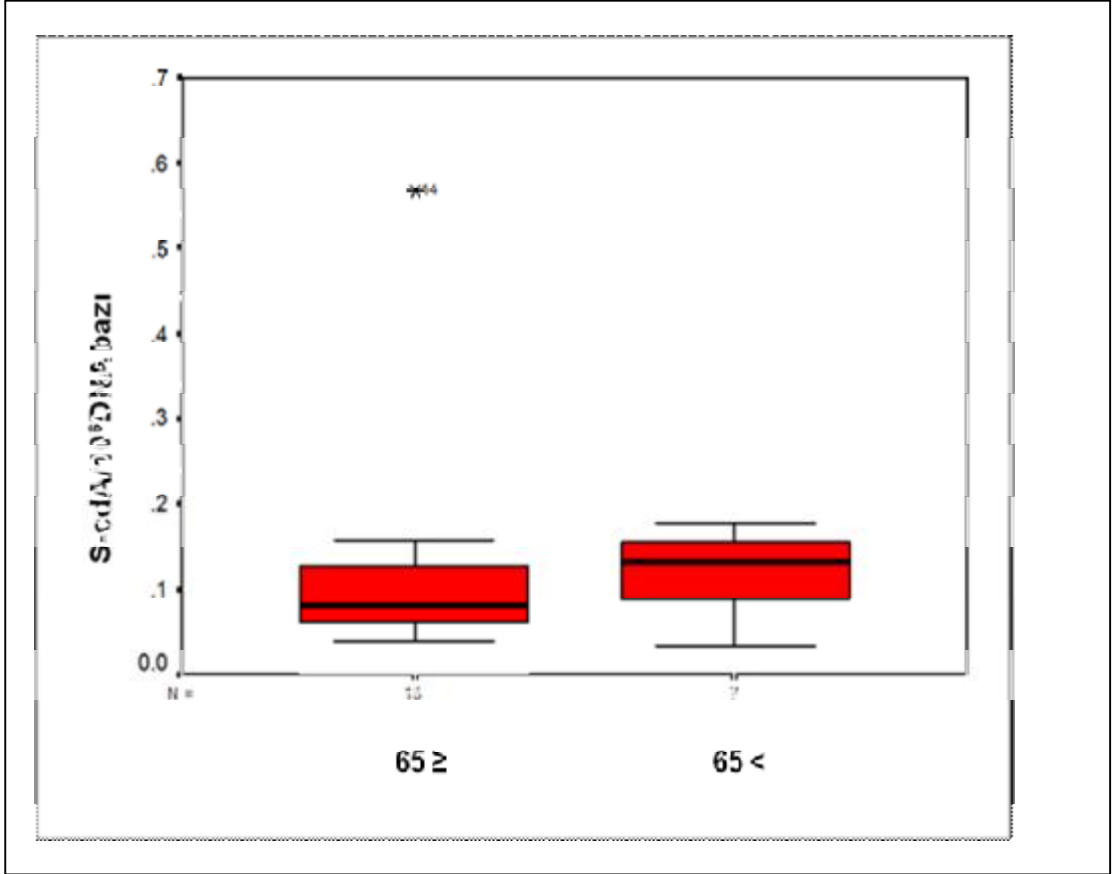
üstünde ve altındaki yatay çizgilerle gösterilmektedir. LC/MS ölçümlerinde gruplarda örnek sayılarının belirtildiği sayılarda (hasta=17, kontrol=22) olmasının sebebi düşük konsantrasyonlu DNA örneklerinin büyük miktarının GC/MS analizlerinde kullanılmış olmasıdır. Her iki grupta da 50 µg DNA miktarının karşılanamadığı doku DNA'ları analizlere dahil edilemedi.



Şekil 4.3 S-cdA'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği. *p* değeri kontrol ve hasta grubu arasındaki istatistiksel anlamı göstermektedir; (Kontrol *n*=22, Hasta *n*=17, *p*=0.0063; her iki grupta da aykırı değerler kutu üzerinde yıldız ile işaretli olarak gösterilmektedir).

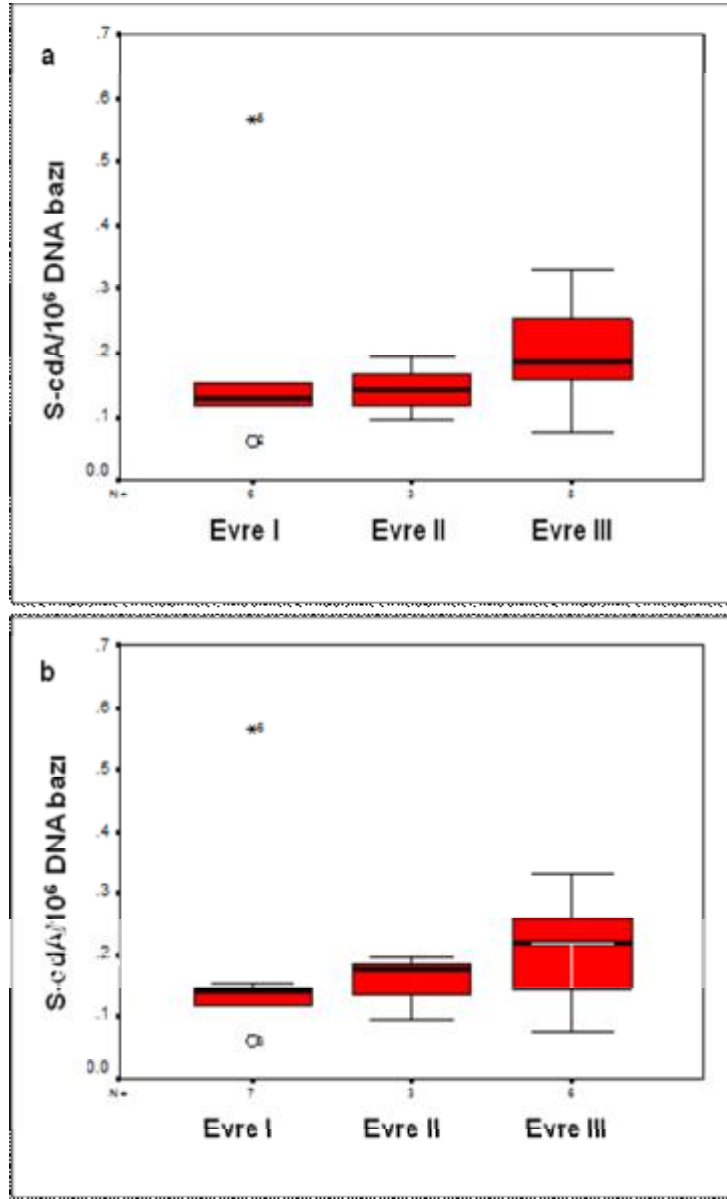
Çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların sağlıklı akciğer dokularında DNA hasarının yaş ile ilişkisinin araştırılması sonucu 65 yaş altı ve üstü hastalarda yaşa bağlı istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (**Şekil 4.4**). Bu karşılaştırma 65 yaş üzeri hastalar için yetersiz örnek sayısı sebebiyle tümör

dokularında gerçekleştirilemedi. Bu durum 65 yaş üzerindeki hastalardan elde edilen tümör dokularında yetersiz DNA miktarı veya bu lezyonun saptanamamasından kaynaklanmaktadır. Çalışmada 65 yaş sınırının kullanılmasının nedeni Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)' e göre yaşlılık sınırının 65 olması ve çalışmaya katılan hastaların yaş grubunda medyan değerinin 65 olarak bulunmasıdır (200).



Şekil 4.4 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol dokularında yaşa bağlı S-cdA düzeyleri

Ayrıca çalışmada S-cdA'nın tümörün evresi ile ilişkisi de araştırılmıştır. Klinik (Evre I, n=6; Evre II, n=3; Evre III, n=8) ve patolojik (Evre I, n=7; Evre II, n=3; Evre III, n=6) olarak farklı evrelerdeki tümörlerden izole edilen DNA örneklerinde S-cdA miktarında evredekine paralel fakat istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış görüldü (**Şekil 4.5**). Bu sonucu evre gruplarındaki olgu sayısının yetersiz olmasının etkilediği düşünülmektedir.



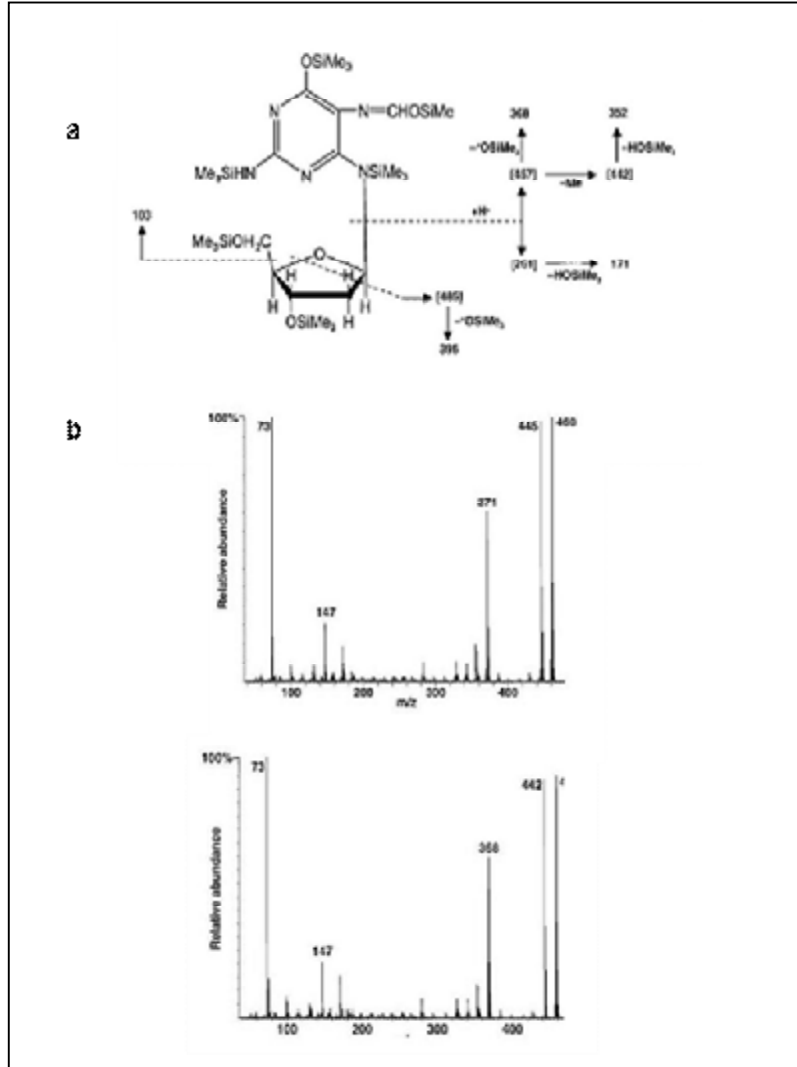
Şekil 4.5 S-cdA düzeylerinin klinik (a) ve patolojik (b) evre açısından karşılaştırılması

Çalışmada S-cdA'nın sigara maruziyeti ile ilişkisi aşağıdaki gibi araştırıldı: Hastalar sigara maruziyetlerine göre: Grup 1: 0-19 paket/yıl, Grup 2: 20-39 paket/yıl, Grup 3: 40-59 paket/yıl, Grup 4: 60-79 paket/yıl, Grup 5: 80-100 paket/yıl şeklinde

gruplara ayrıldı ve DNA'daki bu lezyon ile ilgili olarak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı.

4.2.2 GC/MS ile tanımlanan lezyonlar

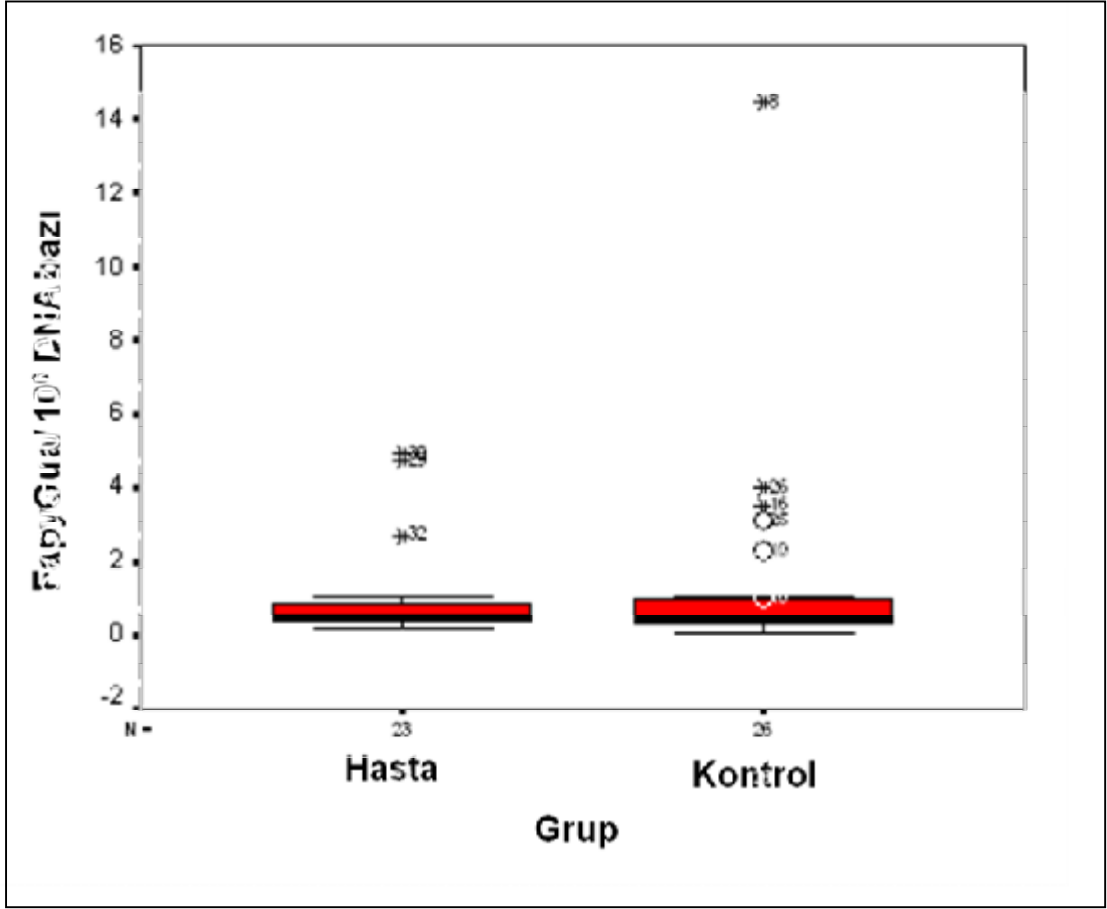
Trimetilsilil ile derivatize edilmiş FapyGua ve bu bileşiğin izotop işaretli analoglarının tipik iyonlarının GC/MS analizleri sırasında elde edilen iyon-akım profilleri ve iyonların parçalanma modelleri **Şekil 4.6**'de gösterilmektedir.



Şekil 4.6 FapydG'nin Me₃Si türevinin yapısı ve başlıca karakteristik iyonlarının parçalanma modeli (a), FapyGua ve FapyGua-¹³C, ¹⁵N₂'nin Me₃Si türevlerinin EI-kütle spektrumları (b)

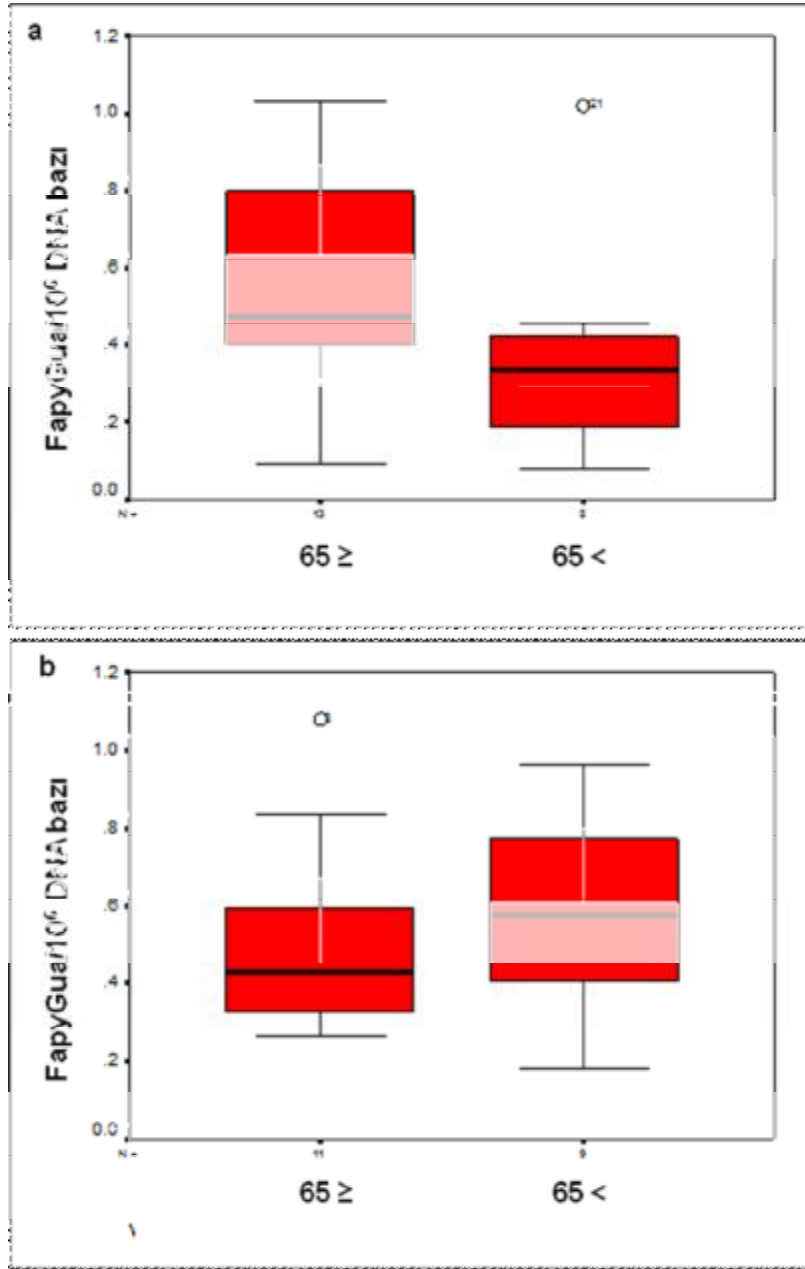
23 hastanın tümör, 26 hastanın ise akciğer sağlıklı kontrol dokularından izole edilen DNA örneklerinin GC/MS ile analizi sonucu FapyGua bazı düzeyi açısından

tümör dokularında, kontrollere göre anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.689$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 FapyGua'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği (Hasta n=23, Kontrol n=26, $p=0.689$)

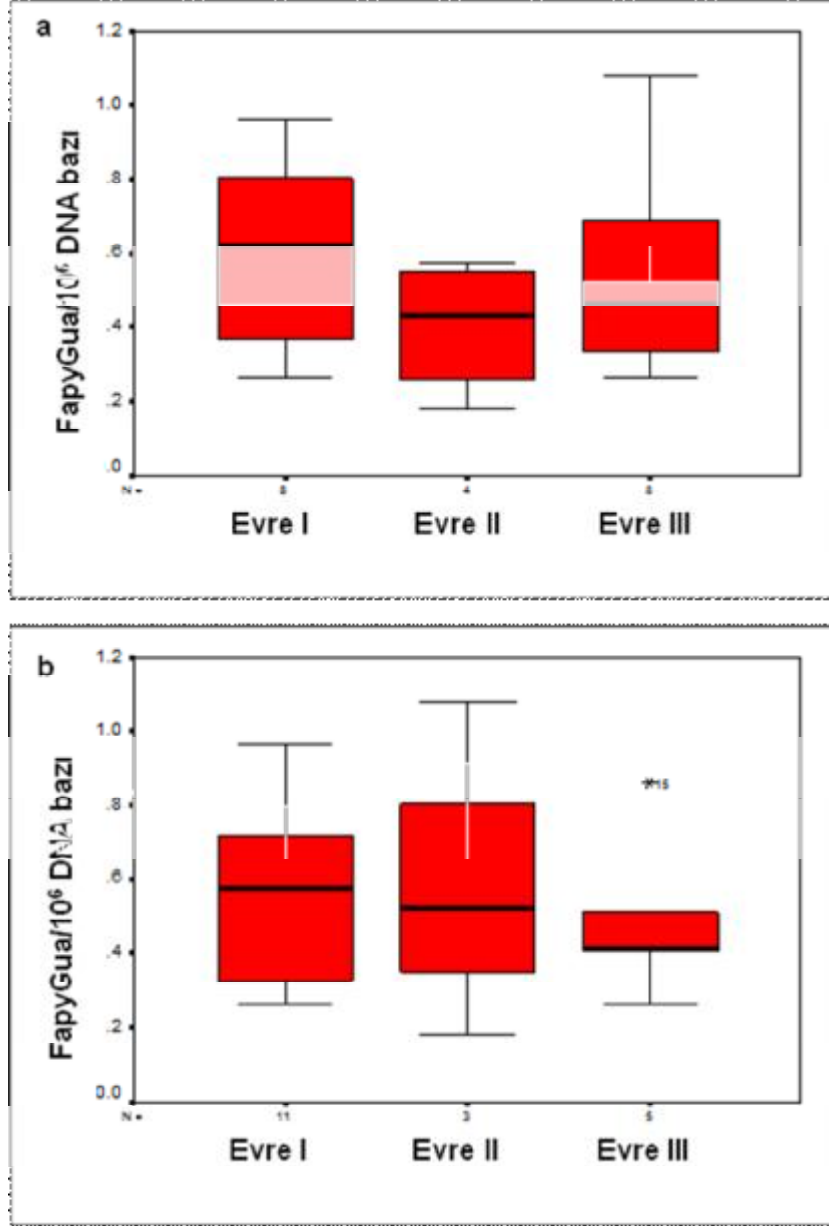
Çalışmada 65 yaş üzerindeki ve altındaki tüm hastalarda kontrol ve tümör dokuları DNA'sı oluşan FapyGua yönünden karşılaştırıldığında, 65 yaş altı hastaların kontrol dokularında ve 65 yaş üzeri hastaların tümör dokularında anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol (a) ve tümör (b) dokularında yaşa bağlı FapyGua bazı düzeyleri

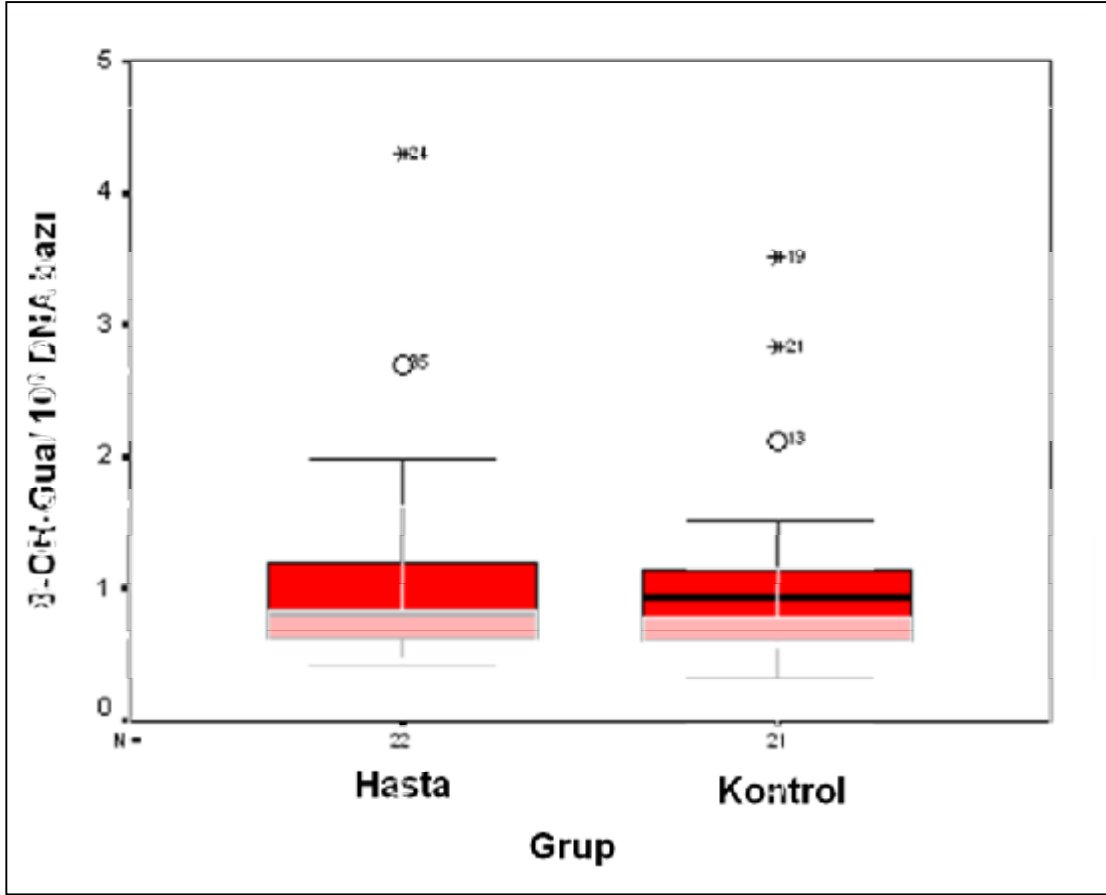
DNA'daki FapyGua miktarının küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda prognostik açıdan öneminin incelenmesi amacıyla patolojik evre ile ilişkisi araştırıldığında yine klinik (Evre I, n=8; Evre II, n=4, Evre III, n=8) ve patolojik (Evre I, n=11; Evre II, n=3, Evre III, n=5) açıdan farklı evrelerdeki tümör dokuları

karşılaştırıldığında tümörün evresi ile bu hasarlı baz arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4.9). Olguların evre gruplarındaki sayısının az olması değerlendirilmelidir.



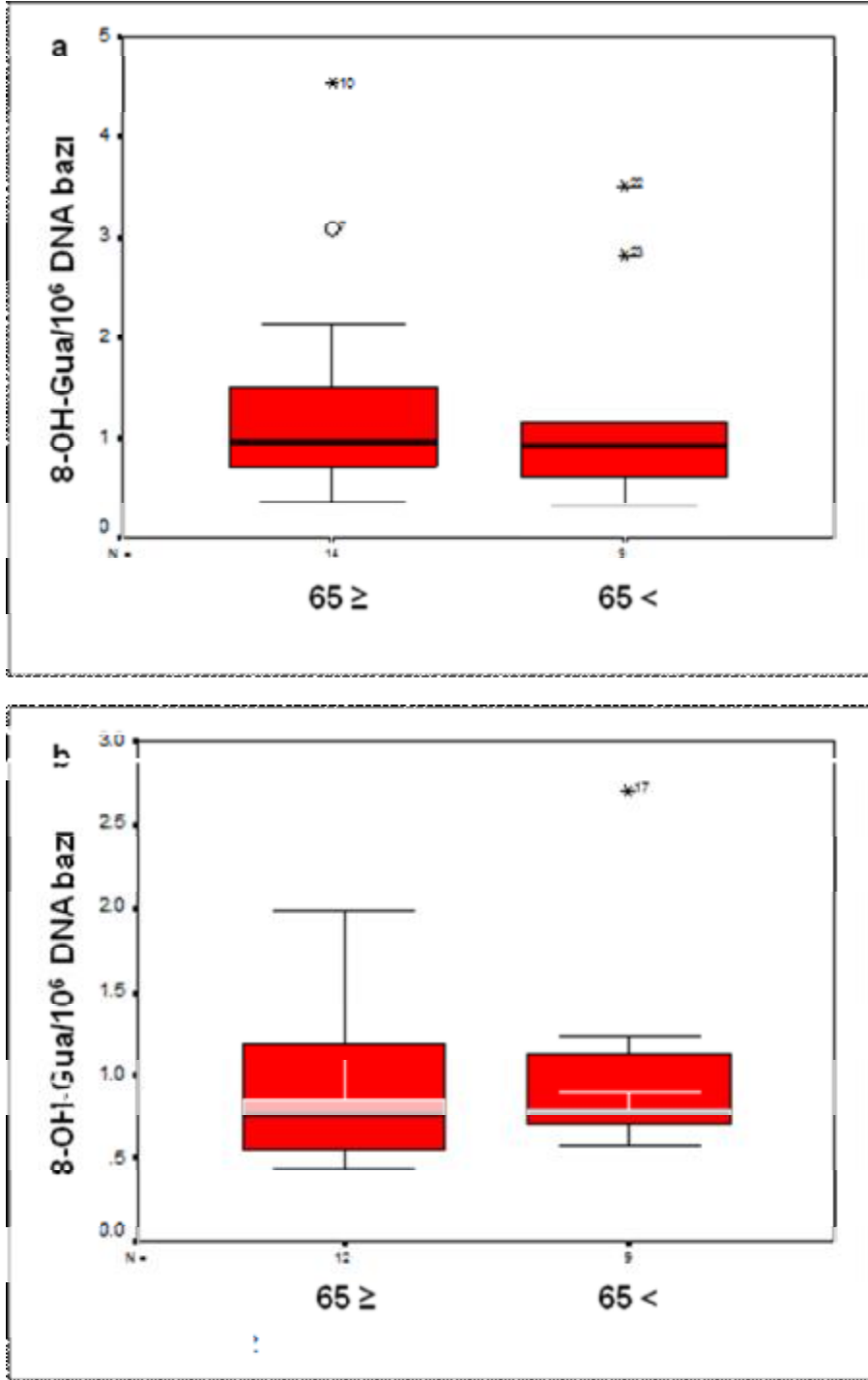
Şekil 4.9 FapyGua bazı düzeylerinin klinik (a) ve patolojik (b) evre açısından karşılaştırılması

Bunların yanısıra hastadan alınan tümör ve kontrol dokularının karşılaştırılması sonucu bir diğer okside baz olan 8-OH-Gua miktarında iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.923$) (Şekil 4.10)



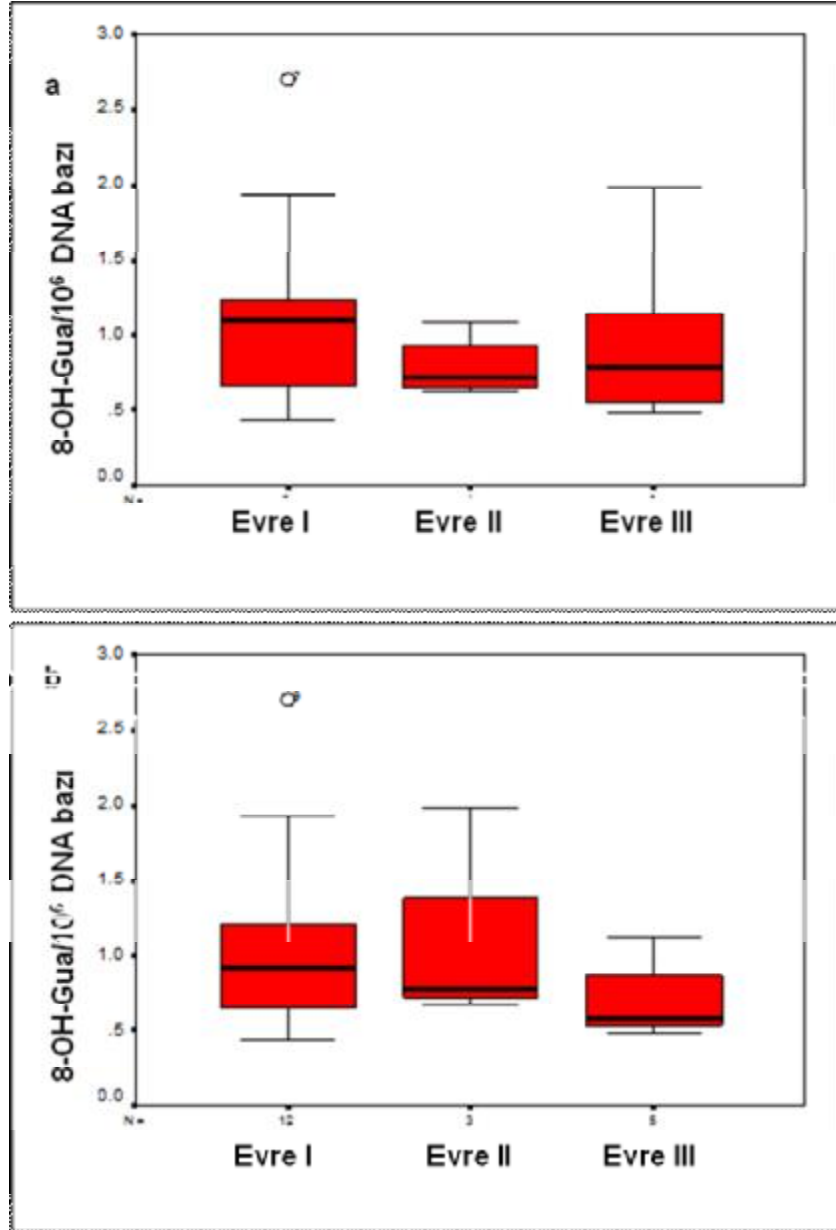
Şekil 4.10 8-OH-Gua'in hasta ve kontrol doku DNA'larındaki düzeylerinin 'box-plot' grafiği. (Hasta n=23, Kontrol n=26, $p=0.689$)

65 yaş altı ve üzerindeki hastalarda tümör ve kontrol grupları 8-OH-Gua açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında yine anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 65 yaş altı ve üzeri hastalarda sağlıklı kontrol (a) ve tümör (b) dokularında yaşa bağlı 8-OH-Gua bazı düzeyleri

Ayrıca bu lezyonun DNA üzerindeki miktarı patolojik evre açısından değerlendirildiğinde, patolojik açıdan Evre I (n=12), Evre II (n=3), Evre III (n=5) düzeyindeki, klinik açıdan ise Evre I (n=9), Evre II (n=4), Evre III (n=8)'deki tümör dokularından alınan DNA örnekleri evre ve 8-OH-Gua düzeyi açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 8-OH-Gua bazı düzeylerinin klinik (a) ve patolojik (b) evre açısından karşılaştırılması

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUC

5.1 TARTIŞMA

Tüm organizmalarda, normal metabolizma ve çevresel ajanlara maruz kalma sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluştuğu bilinmektedir (167). Oluşan bu radikallerin hücre içi hedefleri içinde DNA önemli yer tutmaktadır. DNA'da oksidatif hasara bağlı olarak oluşan mutasyonların karsinogenezin başlangıç, ilerleme ve maligniteye dönüşüm evrelerinin herbirinde potansiyel rol sahibi olduğu pek çok çalışma ile gösterilmektedir (26,168-171). DNA hasarının yüksek düzeyde görüldüğü kanser türlerinin başında sigara içimi, mesleki maruziyet ve yaşa bağlı olarak akciğer kanseri gelmektedir. DNA'daki oksidatif lezyonların miktarının çoğu kanser türünde artmış olduğu yapılan pek çok çalışma ile gösterilmektedir. Örneğin *Olinski* ve ark.'nın (172) akciğer, beyin, kolon, mide ve ovaryum kanseri gibi kanser türlerinde yaptıkları çalışmada, belirtilen kanserlere sahip olan hastaların kromatinlerindeki oksidatif lezyon miktarının sağlıklı çevre dokuya göre 7 kata kadar artmış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada hem pirimidin hem pürin türevli lezyonlarda en yüksek artışın akciğer kanserinde olduğu da rapor edilmiştir.

8-OH-Gua oldukça mutajenik bir lezyondur ve DNA üzerinde $G \rightarrow T$ dönüşümlerine yol açmaktadır. Akciğer kanseri ile oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çok çalışmada, kanser oluşumunun oksidatif lezyon düzeylerindeki artış ile yakından ilişkili olduğu gösterilmektedir. *Inoue* ve ark.'nın (8) yaptığı çalışmada akciğer kanserli dokulardaki 8-OH-dG miktarının normal bireylerden alınan kontrol dokularına nazaran artmış olduğu bulunmuştur. *Vulimiri* ve ark.'nın (9) yaptığı çalışmada ise akciğer kanserli hastaların lenfosit DNA'larında 8-OH-dG düzeylerinin kontrole göre anlamlı ölçüde artmış olduğu görülmüştür.

Literatürün aksine *Hardie* ve ark. (10) yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamız ile de paralel olarak küçük hücreli akciğer kanserli hastaların tümör ve tümör olmayan dokularında, 8-OH-dG düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık gözlemediklerini rapor etmektedirler. Guaninin oksidatif hasara maruz kalması sonucunda oluşan lezyonlar arasında 8-OH-Gua'nin çok geniş çapta araştırıldığı kuşkusuzdur. Fakat yapılan çalışmalara bakıldığında genellikle 8-OH-dG üzerine yoğunlaşıldığı görülmektedir. Çalışmamızda DNA üzerinde oksidatif hasar sonucu oluşan 8-OH-Gua bazının miktarı küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan alınan dokularda araştırıldı ve 8-OH-Gua baz miktarında tümör dokularında kontroldekine göre anlamlı bir artış olmadığı gözlemlendi. Hastaların çoğunda yüksek miktarda sigara maruziyeti söz konusu olduğu göz önüne alındığında bu hastalarda kanserli olmayan dokularda da bu hasarın artmış olması ihtimal dahilindedir. İkinci bir olasılık ise, kanserli dokularda tamir mekanizmalarının tümör oluşumuna ve kemoterapiye yanıt olarak daha aktif hale gelmesi ile bu lezyonun tümör dokularında tamir edilmiş olmasıdır. Kanser hücrelerinin çeşitli metabolik aktiviteler açısından kanser olmayan hücrelere göre farklılık göstermesi yine bu hücrelerde DNA hasarının oluşması veya oluşumunun engellenmesi yönünde etki oluşturabilir. Bunun yanısıra bazı kanser hücrelerinin hipoksik koşullarda da yaşamını sürdürüyor olması ve anaerobik mekanizma ile enerjilerini sağlamaları daha az oksidatif DNA baz hasarının meydana gelmesinde bir neden olabilir. Bu nedenle kanser hücrelerindeki çeşitli metabolik olayların aydınlatılması ve yukarıda adı geçen baz hasarlarının yanısıra çok çeşitli tamir enzim genlerinin ekspresyonunun incelenmesinin de konunun açıklığa kavuşması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Buna paralel olarak çok yakın zamanda *Cancer Research* dergisinde yayınlanan, *Saviozzi* ve ark.'nın (173) gerçekleştirdiği çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan elde edilen doku örneklerinde yaklaşık 22 DNA tamir geninin ekspresyonu araştırılmış ve *XRCC1*, *OGG1* ve *UNG* olmak üzere üç BER ile ilişkili tamir geninden *XRCC1* ve *UNG*'nin ekspresyonunun tümör dokularında normal doku ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmış olduğu rapor edilmektedir. 8-OH-Gua'nin en önemli tamir enzimlerinden biri olan *OGG1* geninde anlamlı bir artış olmadığı dikkat çekse de bu lezyonun tamirinde *OGG1*'in yanısıra *MYH*, *OGG2*, *NEIL1* gibi pek çok tamir enziminin rol alması tamir edilmiş olma olasılığını artırmaktadır (29).

Formamidopirimidinler, DNA'da 'OH saldırılarının ana ürünlerindedir. Biyolojik önemleri hakkında çok fazla bilgi olmamasına rağmen, guaninin metilasyonu sonucu oluşan 5-Me-FapyGua'nin güçlü bir *in vitro* replikasyon engeli olduğu bilinmektedir (132). Bununla birlikte son yıllarda bu bazları içeren oligomerlerle yapılan çalışmalar, metil grubunun FapyGua'ne bağlanması sonucunda oluşan bu lezyonun replikasyonu engellemesinden ziyade mutajenik özellik gösterdiğini desteklemektedir (132,134,174).

Ayrıca *Delaney* ve ark.'nın (174) yaptıkları çalışmada A ve G yanlış eşleşmesinin, 8-OH-Ade oluşumundan 3-8 kat daha fazla olasılık göstermesi, FapyAde'nin 8-OH-Ade'den daha mutajenik olduğunu açığa çıkarmıştır. Biz bu çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanser dokusu ve sağlıklı çevre dokudan izole edilen DNA örnekleri arasında diğer bir formamidopirimidin olan FapyGua düzeylerinde anlamlı bir farklılık olmadığını gördük. FapyGua'nin DNA'dan uzaklaştırılması 8-OH-Gua'dekine yakın bir yeterlilik ile *hOGG1* onarım enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir (125). *Wikman* ve ark.'nın (175) yaptıkları çalışmada akciğer kanserli hastalarda *hOGG1* gen bölgesinde heterozigosite kaybı olduğu gösterilmiştir. *Mambo* ve ark.'nın (106) 18 akciğer kanseri hücre hattında gerçekleştirdikleri çalışmada ise, hücre hatlarının çoğunda *hOGG1* mRNA ve protein ekspresyon düzeyinde artış görülmesine rağmen, iki hücre hattında % 80'e yakın azalma bildirilmektedir. Yine bu hücre hatlarında söz konusu tamir enzimideki azalışa paralel olarak hem genomik hem mitokondri DNA'sında 8-OH-Gua'nin uzaklaştırılmasında büyük bir azalma gözlenmiştir. Aynı yetersizliğin bu enzimin bir diğer substratı olan FapyGua için de geçerli olması olasılık dahilindedir. *Butkiewicz* ve ark.'nın (176) yaptıkları çalışmada, DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin DNA tamirinin yeterliliğindeki değişikliklere neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte *hOGG1* genindeki polimorfizmlerin akciğer kanseri gelişiminde rol aldığı da yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir (177). Özel olarak *hOGG1* Ser326Cys polimorfizminin akciğer kanserinde yaygın olarak görülmesi ve bu kanser tipinde *hOGG1* aktivitesinin azalmış olduğunun bulunması bu polimorfizmin akciğer kanserinde önemli bir rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. Çalışmamızda bu onarım enziminin substratları olduğu bilinen 8-OH-Gua ve FapyGua bazlarının sağlıklı ve tümör dokularında benzer düzeylerde bulunması; *hOGG1* da dahil olmak

üzere bu iki lezyonun tamirinden sorumlu enzim düzeylerinin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Oktay ve ark. ile Öztürk ve ark. (yayınlanmamış veriler) sırasıyla kolon kanser dokusu ile karaciğer ve meme kanseri DNA'larında gerçekleştirdikleri çalışmalarda okside baz düzeylerini hasta dokularda kontroldekilere göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Bu veriler de, söz konusu baz hasarlarının kansere yanıt olarak olasılıkla onarıldığı anlamını taşımaktadır. Ayrıca söz konusu kanserlere karşı uygulanmış kemoterapi yöntemi ve miktarı da, bu hasarın tamiri dolayısıyla da hastalığın seyri açısından önemlidir. Kanser hücrelerinde DNA'nın hasara uğratılmasına yönelik tedavilerde, kanserli dokunun tedaviye direnç kazanması açısından bu verilerin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu dokularda gen, protein ve enzim aktivitesi düzeyinde yapılacak olan çalışmalar konuya açıklık kazandırması açısından önem taşımaktadır.

8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (S-cdA), hidroksil radikalının 2'-deoksiadenozinin şeker artığına saldırması ile oluşan temel ürünlerdendir. C5' merkezli şeker radikalının oksijen yokluğunda aynı molekülde pürin halkasının 8. karbonuna saldırması sonucu oluşmaktadır (163). Yapılan çalışmalarda sulu çözeltilerde iyonize radyasyona maruz bırakılmış DNA moleküllerinde bu lezyonun 5'R ve 5'S diastereomerleri tanımlanmıştır (68,69). Canlı hücrelerde heliks kırıcı 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin oluşumu, transkripsiyonun engellenmesi, gen ekspresyonunun inhibisyonu ve transkripsiyonel mutagenез gibi oldukça zararlı sonuçlara neden olmaktadır (178). S-cdA'nın transkripsiyonda ve DNA polimeraz aktivitesinde güçlü bir engel olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (179-181). S-cdA, C5' ve C8' pozisyonları arasındaki oluşan kovalent bağ nedeniyle DNA'nın heliks yapısında bozulmalara neden olur (182-185). Buna ek olarak, S-cdA nöronal gen ekspresyonunun engellenmesi ile nükleotid kesme-çıkarma onarımında yetersizliğe neden olur (186). S-cdA'nın tamirindeki yavaşlık hastalıkların ilerlemesinde bu sitotoksik lezyonların rol aldığını desteklemektedir (179,180). *Anderson* ve ark. (187) sağlıklı kadın meme dokusunda tanımlanan S-cdA'nın meme kanserine ilişkin gen ekspresyonundaki değişiklikleri de içeren önemli biyolojik etkilere sahip olduğunu önermişlerdir. *Nayaga* ve ark.'nın (188) yaptıkları çalışmada meme kanserinin etyolojisinde 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin de içeren oksidatif DNA hasarının önemli rol aldığı rapor edilmiştir. *Szatrowski* ve ark.'nın (189) malign ve malign olmayan meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada ise, H₂O₂

maruziyetinden sonra malign hücre hatlarında malign olmayan hücre hatlarına göre daha fazla S-cdA birikimi olduğu bulunmuştur. Söz konusu çalışmada aynı hücre hatlarının oksidatif strese maruz kalmamaları halinde, sağlıklı kontrol hücre hatlarındakine benzer oranda S-cdA birikiminin olması, meme kanserinde tamir mekanizmasının yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. Bu lezyonda şeker ve baz artışı arasındaki kovalent bağın varlığı nedeniyle tamirinin baz kesme-çıkarma onarımı yerine nükleotid kesme-çıkarma onarımı ile olabileceği *Dizdaroğlu* ve ark. (68) ile *Dirksen* ve ark. (69) tarafından önerilmiştir. Ayrıca buna ek olarak, iki farklı 5'R ve 5'S-diastereomerinin tamir mekanizmaları tarafından farklı şekillerde onarılabilmesi de belirtilmiştir. *Brooks* ve ark. (180) ile *Kuraoka* ve ark.'nın (179,181) yaptıkları çalışmalarda 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinin baz kesme çıkarma tamiri yerine nükleotid kesme-çıkarma tamiri ile tamir edildiğine dair bulgular sunulmuş ve 5'R-diastereomerinin 5'S-diastereomerine göre daha etkili bir şekilde tamir edildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda, küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların akciğer dokularından elde edilen tümör DNA'larında çevre kontrol dokudan elde edilenlere göre S-cdA (8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinin 5'S-diastereomeri) düzeyinde anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p=0.0063$). *Saviozzi* ve ark.'nın (173) yukarıda adı geçen çalışması değerlendirildiğinde küçük hücreli olmayan akciğer kanser hastalarının tümör dokularında araştırılan 22 tamir geni arasında yalnızca NER yolağında rol alan genlerde anlamlı bir ekspresyon artışına rastlanmamış olması bu kanser türünde 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinin onarımındaki yetersizliğe dikkati çekmekte ve bulgularımızla uyum sağlamaktadır.

Yaşlanma ile, tüm potansiyel hasar verici radikallere karşı antioksidan savunmadaki yetersizliğin hasarın birikmesine ve fonksiyonun aşamalı olarak kaybedilmesine neden olduğu bilinmektedir (190). Yapılan pek çok çalışma ile yaşlanma ve oksidatif stres arasındaki ilişki güçlü bir şekilde ortaya konmuştur (191). Yaşa bağlı oksidatif DNA lezyon birikimi eklemek mayasından insana kadar pek çok organizmada gözlenmiştir (192,193). Yaş ile oksidatif stres belirteçleri arasındaki korelasyonlar araştırılmış ve hasta bireylerin yanı sıra farklı yaşlardan sağlıklı bireyler arasında yapılan çalışmalarda da yaşa bağlı olarak serum 8-OH-dG düzeyinin arttığı savunulmaktadır (194). *Shen* ve ark.'nın (195) yaptıkları çalışmada, KHOAK'li hastalardan alınan DNA örneklerindeki 8-OH-dG miktarının yaş ile ilişkili olarak

artmış olduğunu gözlenmişlerdir. Bununla birlikte tamir aktivitesinin de yaşa bağlı azalabileceği, *Hirano* ve ark.'nın (196) fibroblast hücreleri ile yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca oksidatif DNA lezyonlarının birikiminde BER tamir mekanizmasının yaş ile paralel olarak yavaşlamasının yardımcı rol oynadığını destekleyen kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin *Krishna* ve ark.'nın (197) çalışmasında sıçan sinir hücrelerinde BER aktivitesinin yaş artışı ile gözle görülür bir şekilde azaldığı rapor edilmektedir. *Zhao* ve ark. (198) tümü adenokarsinom olan 99 KHOAK'li hastanın tümör dokusunda gerçekleştirdikleri araştırmada yaş ve sigara maruziyetinin yüksek olduğu bu hastalarda DNA'daki abazik bölge sayısının anlamlı ölçüde artmış olduğu gözlenmişlerdir. Ancak abazik bölgeler, şeker hasarının yanısıra tamir mekanizmalarında hasara spesifik iş gören enzimler tarafından da onarım sırasında oluşturulabilmektedir. Dolayısıyla bu hasarın artışıyla beraber tamir enzimlerindeki aktivitenin artmış olma ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda hem kontrol hem patolojik dokularda 8-OH-Gua, FapyGua ve S-cdA'nın DNA'daki miktarlarında yaşa bağlı anlamlı bir artış belirlenmedi.

Sigara ile oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılmasına yönelik sayısız çalışma gerçekleştirilmiştir. Sigaranın içinde bulundurduğu pek çok karsinojenik ajan nedeniyle, yoğun sigara içen akciğer kanserli hastalarda, hiç içmeyen veya az miktarda içen hastalara göre daha yüksek düzeyde oksidatif DNA hasarı gözlenmesi beklenmiştir. Buna bağlı olarak pek çok çalışmada yaygın bir belirteç olan 8-OH-dG'in idrar düzeyi ile sigara içimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. *Kanaya* ve ark. (116) ile *Gackowski* ve ark.'nın (124) yaptıkları çalışmalarda sırasıyla idrar ve lökosit 8-OH-dG düzeylerinin sigara içen grupta sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte *Asami* ve ark. (112) sigara içen ve içmeyen kişilerin akciğer dokuları ile yaptıkları çalışmada sigara içenlerin akciğer dokularındaki 8-OH-dG düzeyinin içmeyenlere göre 1.5 kat fazla olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda yıllık sigara maruziyetine göre gruplandırılan kontrol ve tümör dokularının her ikisinde de bu maruziyete bağlı anlamlı bir artış saptanmadı. Sigara maruziyeti, yaş, tümörün varlığı ve tüm hastalarda olmamakla birlikte kemoterapi uygulamasını, birbirinden ayrı olarak değerlendirmenin mümkün olamayacağı açıktır. Yaşa ve sigara maruziyetine bağlı olarak ayrılan gruplar arasında, araştırılan lezyon düzeylerinde anlamlı farklılığa rastlanmamış olması, bu

dokularda oksidatif DNA hasarında hastalık öncesi ve sırasında pek çok etkenin rol alabileceği sonucunu doğurmaktadır. Bunun da ilgili alanda gelecekteki çalışmalara farklı boyutlar kazandırması açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

Oksidatif DNA hasarının kanser oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol aldığı bilinmektedir. *Miyake* ve ark.'nın (199) renal hücre karsinomlu hastalar arasında yaptıkları çalışmada, 8-OH-dG düzeyi ile maksimal tümör çapı, klinik evre, uzak metastaz, patolojik evre ve mikroskopik venöz yayılım arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir. *Shen* ve ark.'nın (195) KHOAK'li hastalarda yaptıkları çalışmada, 8-OH-dG düzeylerinin III. ve IV. evre tümörlerinde, I. ve II. evredekilere göre artmış olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise KHOAK hastalarında evre ile okside baz ve nukleozid lezyonları, ilk kez geniş bir ürün yelpazesi içerisinde araştırıldı. DNA'daki okside lezyonların küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda prognostik önemlerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen istatistik değerlendirmeler sonucu klinik ve patolojik olarak Evre I, Evre II ve Evre III'deki KHOAK DNA'larında oksidatif hasar açısından anlamlı bir ilişki bulunmadı.

5.2. SONUÇ

Sunduğumuz bu çalışma küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda oksidatif DNA lezyonların ilk kez bu kadar geniş bir biçimde araştırılmış olması açısından önem taşımaktadır. Bilindiği gibi DNA hasarı, akciğer kanserinin etyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Bu sürece hangi moleküllerin ne derecede dahil olduğunun bilinmesi bu hastalığın teşhisi ve tedavisi açısından önem arz etmektedir. Tümör DNA'larında artmış olduğu gözlenen S-cdA gibi lezyonların kan ve idrar düzeylerinin daha geniş çapta incelenmesi ile günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan 8-OH-dG gibi oksidatif belirteçlerin literatüre kazandırılması mümkündür. Ayrıca DNA üzerinde oluşan lezyonların tamirinde görevli olan enzimlerin aktivite ve ekspresyonlarındaki artış veya azalışın belirlenmesi, uygulanacak tedavi metodlarının seçimi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından klinik öneme sahiptir.

6. KAYNAKLAR

1. <http://www.cancer.org/downloads/PRO/LungCancer.pdf>
2. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang Q, Seminara D, Minna J, Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *American journal of human genetics* 2004;75(3):460-474.
3. Nickolof JA, Hoekstra MF, Contemporary Cancer Research, Humana Press, DNA damage and repair, Volume 1: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes, 1998; 65-6
4. Roberfoid MB, Calderon PB, Free radicals and oxidation phenomena in biological systems, CRC Press, 1995; 92-93
5. Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 1997;131:1-87
6. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British medical bulletin* 1993;49(3):523-544
7. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacology & therapeutics* 1992;53(1):127-166
8. Inoue M, Osaki T, Noguchi M, Hirohashi S, Yasumoto K, Kasai H. Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Jpn J Cancer Res.* Volume 89; 1998. p 691-695
9. Vulimiri SV, Wu X, Baer-Dubowska W, Andrade M, Detry M, Spitz MR, DiGiovanni J. Analysis of aromatic DNA adducts and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in lymphocyte DNA from a case-control study of lung cancer involving minority populations. *Molecular carcinogenesis* 2000;27(4):330
10. Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, Allan JM, King RF, Williams GI, Wild CP. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p

chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis* 2000;21(2):167-172

11. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine* 2008;359(13):1367-1380

12. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta: AmericanCancer Society, 2008

13. Akkoçlu A. Akciğer kanserlerinde tanı, evreleme ve tedavi öncesi değerlendirme. Türk Toraks Derneği, <http://www.toraks.org.tr/kisokulu-ppt-pdf/akkoc.pdf>

14. American Joint Committee on Cancer, *Cancer Staging Manual*, Sixth Edition, 2002; 171-172

15. Topuz E, Aydın A. Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu, 2006; Nobel Tıp Kitabevi

16. Akciğer Kanseri, Dr. Tuncay Göksel, www.toraks.org.tr/kisokulu4-ppt-pdf/Tuncay_Goksel.pdf

17. Galanis E, Frytak S, Lloyd RV. Extrapulmonary small cell carcinoma. *Cancer* 1997;79(9):1729-1736

18. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001;18(6):1059-1068

19. Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Molecular cancer* 2008;7:81

20. Darling GE, Shepherd FA. Surgical management of small cell lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Johnson DH, Minna JD, Turrisi AT, eds. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins. 2005:475-490

21. Caporaso N, Landi MT, Vineis P. Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence. *Pharmacogenetics* 1991;1(1):4-19

22. Sellers TA, Chen PL, Potter JD, Bailey-Wilson JE, Rothschild H, Elston RC. Segregation analysis of smoking-associated malignancies: evidence for Mendelian inheritance. *American journal of medical genetics* 1994;52(3):308-314

23. Devereux TR, Taylor JA, Barrett JC. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. Chest 1996;109(3 Suppl):14S-19S
24. Köktürk N, Kırışlıoğlu CE, Öztürk C. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi, Solunum, 2003; Vol: 5; Sayı 3: 127-138
25. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, YYU Vet Fak Dergisi, 2004; 15(1-2): 91-96
26. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb J 2003;17(10):1195-1214
27. Caporaso N. The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer. Journal of the National Cancer Institute 2003;95(17):1263-1265
28. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. Nature 2007;447(7147):941-950
29. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation research 2004;567(1):1-61
30. Reddy P, Jaruga P, O'Connor T, Rodriguez H, Dizdaroglu M. Overexpression and rapid purification of Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Protein expression and purification 2004;34(1):126-133
31. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free radical biology & medicine 2002;32(11):1102-1115
32. C. von Sonntag, The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor and Francis, New York, 1987
33. Fujita S, Steenken S. Pattern of OH radical addition to uracil and methyl- and carboxyl substituted uracils. Electron transfer of OH adducts with N,N,N,N-tetramethylp- phenylenediamine and tetranitromethane, J. Am. Chem.Soc. 1981;103:2540-2545
34. Hazra DK, Steenken S. Pattern of OH radical addition to cytosine and 1-, 3-, 5-, and 6-substituted cytosines, J. Am. Chem. Soc. 1983;105:4380-4386
35. Steenken S. Addition-elimination paths in electron-transfer reactions between radicals and molecules, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 1987;83:113-124.
36. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. Mutation research 1992;275(3-6):331-342

37. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine* 1995;18(6):1033-1077
38. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 1987;51(4):573-589
39. J.R. Wagner, J.E. Van Lier, M. Berger, J. Cadet, Thymidine hydroperoxides: structural assignments, conformational features and thermal decomposition in water, *J. Am. Chem. Soc.* 1994;116:2235–2242
40. Teoule R, Cadet J. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances--final products. *Molecular biology, biochemistry, and biophysics* 1978;27:171-203
41. Dizdaroglu M, Holwitt E, Hagan MP, Blakely WF. Formation of cytosine glycol and 5,6-dihydroxycytosine in deoxyribonucleic acid on treatment with osmium tetroxide. *The Biochemical journal* 1986;235(2):531-536
42. Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S. Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 1993;32(45):12105-12111
43. J.R. Wagner, Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionising radiation, *J. Chim. Phys.* 1994;91:1280-1286
44. R. Behrend, O. Roosen, Synthese der Harnsaure, *Justus Y44 Liebigs Ann. Chem.* 1889; 251:235–256
45. Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS letters* 1993;315(1):1-6
46. O'Neill P. Pulse radiolytic study of the interaction of thiols and ascorbate with OH adducts of dGMP and dG: implications for DNA repair processes. *Radiation research* 1983;96(1):198-210
47. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox Chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts, *Chem. Rev.* 1989;89:503–520
48. Candeias LP, Steenken S. Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and

their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)*. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2000;6(3):475-484

49. Vieira AJSC, Steenken S. Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterisation of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions, J. Am. Chem. Soc. 1990;112:6986–6994

50. O'Neill P, Chapman PW. Potential repair of free radical adducts of dGMP and dG by a series of reductants. A pulse radiolytic study. International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine 1985;47(1):71-80

51. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. Biochemistry 1992;31(1):106-110

52. Doetsch PW, Zasatawny TH, Martin AM, Dizdaroglu M. Monomeric base damage products from adenine, guanine, and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation. Biochemistry 1995;34(3):737-742

53. Cadet J, Berger M, Decarroz C, Mouret JF, Vanlier JE, Wagner RJ. Photoinduced and radio-induced radical oxidation of the purine and pyrimidine bases of nucleic acids, J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol. 1991; 88:1021–1042

54. Cadet J, Berger M, Buchko GW, Joshi PC, Raoul S, Ravanat J-L. 2,2-Diamino-4-[3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl] amino]-5-(2H)-oxazolone—a novel and predominant radical oxidation product of 3,5-di-O-acetyl-2-deoxyguanosine, J. Am. Chem. Soc. 1994;116:7403–7404

55. Raoul S, Berger M, Buchko GW, Joshi PC, Morin B, Weinfeld M, Cadet J. H-1, C-13 and N-15 nuclear magnetic resonance analysis and chemical features of the two main radical oxidation products of 2-deoxyguanosine: oxazolone and imidazolone nucleosides, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1996; 23: 371–381

56. Duarte V, Gasparutto D, Jaquinod M, Cadet J. In vitro DNA synthesis opposite oxazolone and repair of this DNA damage using modified oligonucleotides. Nucleic acids research 2000;28(7):1555-1563

57. Dizdaroglu M. Mechanisms of free radical damage to DNA, in: O.I. Aruoma (Ed.), DNA & Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications, OICA International, Saint Lu
58. Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C. Radiation chemistry of DNA. II. Strand breaks and sugarrelease by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen, Z. Naturforsch. C 1975;30:826–828
59. Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C. Isolation of 2-deoxy-d-erythropentonic acid from an alkalilabile site in gamma-irradiated DNA, Int. J. Radiat. Biol.Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1977;32: 481–483
60. Beesk F, Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C. Radiation-induced DNA strand breaks in deoxygenated aqueous solutions. The formation of altered sugars as end groups. International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine 1979;36(6):565-576.
61. Behrens G, Koltzenburg G, Ritter A, Schulte-Frohlinde D. The influence of protonation or alkylation of the phosphate group on the e.s.r. spectra and on the rate of phosphate elimination from 2-methoxyethyl phosphate 2-yl radicals. International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine 1978;33(2):163-171
62. Behrens G, Koltzenburg G, Schulte-Frohlinde D. Model reactions for the degradation of DNA-4_ radicals in aqueous solution. Fast hydrolysis of a-alkoxyalkyl radicals with a leaving group in the b-position followed by radical rearrangement and elimination reactions, Z. Naturforsch. 1982; C 37:1205–1227
63. Kappen LS, Goldberg IH, Liesch JM. Identification of thymidine-5'-aldehyde at DNA strand breaks induced by neocarzinostatin chromophore. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1982;79(3):744-748
64. Kappen LS, Goldberg IH. Deoxyribonucleic acid damage by neocarzinostatin chromophore: strand breaks generated by selective oxidation of C-5' of deoxyribose. Biochemistry 1983;22(21):4872-4878
65. Goldberg IH. Free radical mechanisms in neocarzinostatin-induced DNA damage. Free radical biology & medicine 1987;3(1):41-54
66. Keck K. [Formation of cyclonucleotides during irradiation of aqueous solutions of purine nucleotides]. Zeitschrift fur Naturforschung 1968;23(8):1034-1043

67. Raleigh JA, Kremers W, Whitehouse R. Radiation chemistry of nucleotides: 8,5'-cyclonucleotide formation and phosphate release initiated by hydroxyl radical attack on adenosine monophosphates. *Radiation research* 1976;65(3):414-422
68. Dizdaroglu M. Free-radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. *The Biochemical journal* 1986;238(1):247-254
69. Dirksen ML, Blakely WF, Holwitt E, Dizdaroglu M. Effect of DNA conformation on the hydroxyl radical-induced formation of 8,5'-cyclopurine 2'-deoxyribonucleoside residues in DNA. *International journal of radiation biology* 1988;54(2):195-204
70. Oleinick NL, Chiu SM, Ramakrishnan N, Xue LY. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells, *Br. J. Cancer Suppl.* 1987;8:135-140
71. Dizdaroglu M, Gajewski E, Reddy P, Margolis SA. Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry* 1989;28(8):3625-3628
72. Nackerdien Z, Rao G, Cacciuttolo MA, Gajewski E, Dizdaroglu M. Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 1991;30(20):4873-4879
73. Olinski R, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H₂O₂-treated cultured human cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 1992;297(1):139-143
74. Powell CL, Swenberg JA, Rusyn I. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer letters* 2005;229(1):1-11
75. Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA repair* 2007;6(4):470-480
76. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 2004;73:39-85

77. McCullough AK, Dodson ML, Lloyd RS. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annual review of biochemistry* 1999;68:255-285
78. Chung MH, Kim HS, Ohtsuka E, Kasai H, Yamamoto F, Nishimura S. An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA+. *Biochemical and biophysical research communications* 1991;178(3):1472-1478
79. Yamamoto F, Kasai H, Bessho T, Chung MH, Inoue H, Ohtsuka E, Hori T, Nishimura S. Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA. *Jpn J Cancer Res* 1992;83(4):351-357
80. Bases R, Franklin WA, Moy T, Mendez F. Enhanced excision repair activity in mammalian cells after ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 1992;62(4):427-441
81. <http://web.deu.edu.tr/saglikbil/Sunumlar/dna2008/Lecture-12,13-DNA-Base-Excision-Repair.ppt>
82. Dizdaroglu M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation research* 2005;591(1-2):45-59
83. Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer letters* 2008;266(1):60-72
84. Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S. Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 2001;68:193-205
85. Wallace SS, Bandaru V, Kathe SD, Bond JP. The enigma of endonuclease VIII. *DNA repair* 2003;2(5):441-453
86. Wilson DM, 3rd, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA repair* 2007;6(4):544-559
87. Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 1999;28:101-128

88. Matsumoto Y, Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* (New York, NY 1995;269(5224):699-702
89. Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(16):9573-9578
90. Klungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal* 1997;16(11):3341-3348
91. Sancar A. DNA excision repair. *Annual review of biochemistry* 1996;65:43-81
92. Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: from *E. coli* to man. *Biochimie* 1999;81(1-2):15-25
93. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(38):23465-23468
94. Wood RD. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 1999;81(1-2):39-44
95. Travers AA. DNA conformation and protein binding. *Annual review of biochemistry* 1989;58:427-452
96. Mu D, Park CH, Matsunaga T, Hsu DS, Reardon JT, Sancar A. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(6):2415-2418
97. Mu D, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(14):8285-8294
98. Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO journal* 1997;16(21):6559-6573
99. Ptashne M, Gann A. 2002. *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
100. Hopfield JJ. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974;71(10):4135-4139

101. Hohl M, Thorel F, Clarkson SG, Scharer OD. Structural determinants for substrate binding and catalysis by the structure-specific endonuclease XPG. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(21):19500-19508
102. B. Giese, Hop to it, *Chem. Britain* 2000;44-46
103. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation research* 2001;488(1):65-76
104. Dizdaroglu M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in enzymology* 1994;234:3-16
105. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation research* 1988;195(3):255-271
106. Mambo E, Chatterjee A, de Souza-Pinto NC, Mayard S, Hogue BA, Hoque MO, Dizdaroglu M, Bohr VA, Sidransky D. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. *Oncogene* 2005;24(28):4496-4508
107. Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer research* 1994;54(7 Suppl):1890s-1894s.
108. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, NY)* 1985;227(4685):375-381
109. T.W. Kensler, B.G. Taffe, Free radicals in tumour promotion, *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2 (1986) 347-387
110. Hoffmann D, Wynder EL. Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. *IARC scientific publications* 1986(74):145-165
111. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental health perspectives* 1985;64:111-126
112. Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997;18(9):1763-1766
113. Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, Chung MH, Kasai H, Nishimura S. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free radical research communications* 1990;11(1-3):23-27

114. Lodovici M, Casalini C, Cariaggi R, Michelucci L, Dolara P. Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free radical biology & medicine* 2000;28(1):13-17
115. Pourcelot S, Faure H, Firoozi F, Ducros V, Tripier M, Hee J, Cadet J, Favier A. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 5-(hydroxymethyl)uracil in smokers. *Free radical research* 1999;30(3):173-180
116. Kanaya S, Ikeya M, Yamamoto K, Moriya T, Furuhashi K, Sonoda M, Goto K, Ochi H. Comparison of an oxidative stress biomarker "urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine," between smokers and non-smokers. *BioFactors* (Oxford, England) 2004;22(1-4):255-258
117. Basu AK, Loechler EL, Leadon SA, Essigmann JM. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86(20):7677-7681
118. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A--C substitutions. *The Journal of biological chemistry* 1992;267(1):166-172
119. Feig DI, Loeb LA. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase beta. *Biochemistry* 1993;32(16):4466-4473
120. Hauser J, Seidman M M, Sidur K, Dixon K. Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells. *Mol. Cell. Biol.* 1986; 6: 277-285
121. Hauser J, Levine AS, Dixon K. Unique pattern of point mutations arising after gene transfer into mammalian cells. *The EMBO journal* 1987;6(1):63-67
122. Seidman MM, Bredberg A, Seetharam S, Kraemer KH, Multiple point mutations in a shuttle vector propagated in human cells: evidence for an error-prone DNA polymerase activity. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 1987;84: 4944-4948
123. Madzak C, Sarasin A. Mutation spectrum following transfection of ultraviolet-irradiated single-stranded or double-stranded shuttle vector DNA into monkey cells. *Journal of molecular biology* 1991;218(4):667-673
124. Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients,

healthy smokers and nonsmokers. *International journal of cancer* 2005;114(1):153-156

125. Dherin C, Radicella JP, Dizdaroglu M, Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic acids research* 1999;27(20):4001-4007

126. Le Page F, Guy A, Cadet J, Sarasin A, Gentil A. Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic acids research* 1998;26(5):1276-1281

127. Culp SJ, Cho BP, Kadlubar FF, Evans FE. Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chemical research in toxicology* 1989;2(6):416-422

128. Guschlbauer W, Duplaa AM, Guy A, Teoule R, Fazakerley GV. Structure and in vitro replication of DNA templates containing 7,8-dihydro-8-oxoadenine. *Nucleic acids research* 1991;19(8):1753-1758

129. Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigmann JM. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 1992;20(22):6023-6032

130. Shibutani S, Margulis LA, Geacintov NE, Grollman AP. Translesional synthesis on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry* 1993;32(29):7531-7541

131. Kamiya H, Miura H, Murata-Kamiya N, Ishikawa H, Sakaguchi T, Inoue H, Sasaki T, Masutani C, Hanaoka F, Nishimura S, et al. 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in in vitro DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells. *Nucleic acids research* 1995;23(15):2893-2899

132. O'Connor TR, Boiteux S, Laval J. Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic acids research* 1988;16(13):5879-5894

133. Graziewicz MA, Zastawny TH, Olinski R, Speina E, Siedlecki J, Tudek B. Fapyadenine is a moderately efficient chain terminator for prokaryotic DNA polymerases. *Free radical biology & medicine* 2000;28(1):75-83

134. Wiederholt CJ, Greenberg MM. Fapy.dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine. *Journal of the American Chemical Society* 2002;124(25):7278-7279
135. Switzer CY, Moroney SE, Benner SA. Enzymatic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine. *Biochemistry* 1993;32(39):10489-10496
136. Kamiya H, Ueda T, Ohgi T, Matsukage A, Kasai H. Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine. *Nucleic acids research* 1995;23(5):761-766
137. Kamiya H, Kasai H. Effect of sequence contexts on misincorporation of nucleotides opposite 2-hydroxyadenine. *FEBS letters* 1996;391(1-2):113-116
138. Kamiya H, Kasai H. Substitution and deletion mutations induced by 2-hydroxyadenine in *Escherichia coli*: effects of sequence contexts in leading and lagging strands. *Nucleic acids research* 1997;25(2):304-311
139. McNulty JM, Jerkovic B, Bolton PH, Basu AK. Replication inhibition and miscoding properties of DNA templates containing a site-specific cis-thymine glycol or urea residue. *Chemical research in toxicology* 1998;11(6):666-673
140. Bienvenu C, Cadet J. Synthesis and Kinetic Study of the Deamination of the Cis Diastereomers of 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydro-5-methyl-2'-deoxycytidine. *The Journal of organic chemistry* 1996;61(8):2632-2637
141. Privat E, Sowers LC. Photochemical deamination and demethylation of 5-methylcytosine. *Chemical research in toxicology* 1996;9(4):745-750
142. Murata-Kamiya N, Kamiya H, Karino N, Ueno Y, Kaji H, Matsuda A, Kasai H. Formation of 5-formyl-2'-deoxycytidine from 5-methyl-2'-deoxycytidine in duplex DNA by Fenton-type reactions and gamma-irradiation. *Nucleic acids research* 1999;27(22):4385-4390
143. Karino N, Ueno Y, Matsuda A. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxycytidine: in vitro DNA polymerase reactions on DNA templates containing 5-formyl-2'-deoxycytidine. *Nucleic acids research* 2001;29(12):2456-2463
144. Roy-Burman S, Roy-Burman P, Visser DW. Studies on the effect of triphosphates of 5-aminouridine and 5-hydroxydeoxyuridine on ribonucleic acid and

deoxyribonucleic acid polymerases. *Biochemical pharmacology* 1970;19(10):2745-2756

145. Purmal AA, Kow YW, Wallace SS. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic acids research* 1994;22(1):72-78.

146. Purmal AA, Kow YW, Wallace SS. 5-Hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic acids research* 1994;22(19):3930-3935

147. Feig DI, Sowers LC, Loeb LA. Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(14):6609-6613

148. Chung W, Boorstein RJ. Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells. *Mutation research* 1997;373(1):125-137

149. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Edited by W.M.A Niessen, *Chromatographic Science Series*, Vol 86: 2-4, <http://books.google.com/books?id=fX3JCQIBDf0C&printsec=frontcover&dq=gas+chromatography+mass+spectrometry&ei=Eg1ESdKeJ4q0NqbIkbYO#PPP1,M1>

150. http://books.google.com/books?id=2L_H2I5STa8C&pg=PA340&dq=gas+chromatography+mass+spectrometry+gc+ms&ei=AlYTSsunHKG2zQT-ue2vCw#PPP1,M1

151. Brandenburg Technical University at Cottbus, Practical Course of Analytical Chemistry, Faculty of Environmental Sciences and Process Engineering, Central Analytical Laboratory, <http://www.zal.tu-cottbus.de/zal/prakt/orgaanal.htm>

152. <http://en.wikipedia.org/wiki/Derivatization>

153. http://books.google.com/books?id=g_cj6bHipBAC&pg=PR11&dq=derivatization&ei=hG8TSrznAoLszATqs_iXAg#PPR11,M1

154. <http://www.ecs.umass.edu/cee/reckhow/courses/772/772112/772112print.pdf>

155. <http://books.google.com/books?id=pqhr5XQZDtUC&pg=PA4&lpg=PA4&dq=mass+spectrometry&source=bll&ots=6kdUwgSZt2&sig=oQfkkg44aLQjUX>

WtJe2psLnbJWQ&hl=en&ei=e2QTSSLvDNTBtwfk34GJCg&sa=X&oi=book_result
&ct=result&resnum=12#PPA4,M1

156. <http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html>
157. <http://www.chem.harvard.edu/mass/tutorials/ei.html>
158. <http://web.deu.edu.tr/saglikbil/Sunumlar/dna2008/Lecture-8,9-GC-LC-MS.ppt>.
159. Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN, Gas Chromatography and Mass Spectrometry A Practical Guide, 1996; 16-19
160. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research 1988;16(3):1215
161. Jaruga P, Theruvathu J, Dizdaroglu M, Brooks PJ. Complete release of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine from dinucleotides, oligodeoxynucleotides and DNA, and direct comparison of its levels in cellular DNA with other oxidatively induced DNA lesions. Nucleic acids research 2004;32(11):e87
162. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. Nucleic acids research 2001;29(3):E12
163. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Identification and quantification of 8,5'-cyclo-2'-deoxy-adenosine in DNA by liquid chromatography/ mass spectrometry. Free radical biology & medicine 2001;30(7):774-784
164. Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroglu M. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. Free radical biology & medicine 2001;31(3):336-344
165. Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H, Dizdaroglu M. Mass spectrometric assays for the tandem lesion 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine in mammalian DNA. Biochemistry 2002;41(11):3703-3711
166. Jaruga P, Kirkali G, Dizdaroglu M. Measurement of formamidopyrimidines in DNA. Free radical biology & medicine 2008;45(12):1601-1609
167. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 2004; 35(4): 159-169

168. Senturker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Muslumanoglu H, Gedikoglu G, Dizdaroglu M. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS letters* 1997;416(3):286-290
169. Malins DC, Haimanot R. Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer research* 1991;51(19):5430-5432
170. Schwarz KB, Kew M, Klein A, Abrams RA, Sitzmann J, Jones L, Sharma S, Britton RS, Di Bisceglie AM, Groopman J. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases and sciences* 2001;46(10):2173-2178
171. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* 1996;313 (Pt 1):17-29
172. Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS letters* 1992;309(2):193-198
173. Saviozzi S, Ceppi P, Novello S, Ghio P, Lo Iacono M, Borasio P, Cambieri A, Volante M, Papotti M, Calogero RA, Scagliotti GV. Non-small cell lung cancer exhibits transcript overexpression of genes associated with homologous recombination and DNA replication pathways. *Cancer research* 2009;69(8):3390-3396
174. Delaney MO, Wiederholt CJ, Greenberg MM. FapydA induces nucleotide misincorporation translesionally by a DNA polymerase, *Angewandte Chemie*, 2002; 41(5): 771-773
175. Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *International journal of cancer* 2000;88(6):932-937
176. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2001;22(4):593-597
177. Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(4):409-412

178. Jaruga P, Dizdaroglu M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA repair* 2008;7(9):1413-1425
179. Kuraoka I, Bender C, Romieu A, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(8):3832-3837
180. Brooks PJ, Wise DS, Berry DA, Kosmoski JV, Smerdon MJ, Somers RL, Mackie H, Spoonde AY, Ackerman EJ, Coleman K, Tarone RE, Robbins JH. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(29):22355-22362
181. Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Oxygen free radical damage to DNA. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(52):49283-49288
182. Haromy TP, Raleigh J, Sundaralingam M. Enzyme-bound conformations of nucleotide substrates. X-ray structure and absolute configuration of 8,5'-cycloadenosine monohydrate. *Biochemistry* 1980;19(8):1718-1722
183. Birnbaum GI, Cygler M, Dudycz L, Stolarski R, Shugar D. Comparison of solid state and solution conformations of R and S epimers of 8,5'-cycloadenosine and their relevance to some enzymatic reactions. *Biochemistry* 1981;20(11):3294-3301
184. Miaskiewicz K, Miller JH, Fuciarelli AF. Theoretical analysis of DNA intrastrand cross linking by formation of 8,5'-cyclodeoxyadenosine. *Nucleic acids research* 1995;23(3):515-521
185. Kirkali G, Tunca M, Genc S, Jaruga P, Dizdaroglu M. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Free radical biology & medicine* 2008;44(3):386-393
186. Brooks PJ. DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications. *Mutation research* 2002;509(1-2):93-108

187. Anderson KM, Jaruga P, Ramsey CR, Gilman NK, Green VM, Rostad SW, Emerman JT, Dizdaroglu M, Malins DC. Structural alterations in breast stromal and epithelial DNA: the influence of 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2006;5(11):1240-1244
188. Nyaga SG, Jaruga P, Lohani A, Dizdaroglu M, Evans MK. Accumulation of oxidatively induced DNA damage in human breast cancer cell lines following treatment with hydrogen peroxide. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2007;6(12):1472-1478
189. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 1991;51(3):794-798
190. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 1998;78(2):547-581
191. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free radical biology & medicine* 2002;33(5):575-586
192. Karanjawala ZE, Lieber MR. DNA damage and aging. *Mechanisms of ageing and development* 2004;125(6):405-416
193. Van Remmen H, Hamilton ML, Richardson A. Oxidative damage to DNA and aging. *Exercise and sport sciences reviews* 2003;31(3):149-153
194. Rattan S., Siboska G E, Wikmar FP, Clark BFC. Ve ark. Levels of oxidative DNA damage product 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human serum increase with age, *Medical Science Research*, 1995; 23:469-470
195. Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2007;109(3):574-580
196. Hirano T, Yamaguchi Y, Hirano H, Kasai H. Age-associated change of 8-hydroxyguanine repair activity in cultured human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 1995;214(3):1157-1162
197. Krishna TH, Mahipal S, Sudhakar A, Sugimoto H, Kalluri R, Rao KS. Reduced DNA gap repair in aging rat neuronal extracts and its restoration by DNA polymerase beta and DNA-ligase. *Journal of neurochemistry* 2005;92(4):818-823
198. Zhao H, Shen J, Deininger P, Hunt JD. Abasic sites and survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Cancer letters* 2007;246(1-2):47-53

199. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. Urology 2004;64(5):1057-1061
200. http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/temel/yaslilik_ve_beslenme.pdf
201. <http://www.ugurgonullu.com/index.php?cat=2&pid=22>

EK 1

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 05.10.2007/354 tarih ve sayılı kararı

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı:05.10.2007/354

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri

Hatice İGCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 01 Kasım 2007 tarih ve 03/23/2007 no.lu toplantısında, 276/2007 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Güldal KIRKALI'nın yöneticisi, Dr.Özlem ŞENOL'un sorumlusu olduğu, "Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde DNA hasarı ve tamir mekanizmaları" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı