

OKSİDATİF DNA HASARI VE YAŞLANMA*

Gülden BURÇAK, Gülnur ANDİCAN

Background and Design.- Reactive oxygen species (ROS) are formed in all living organisms as a by-product of normal metabolism and as a consequence of exposure to environmental agents. ROS attack on DNA generates a multiplicity of DNA damage products, including modified bases. One of the most common oxidative DNA lesions is 8-hydroxy deoxyguanosine (8OHdG). 8OHdG is regarded as a biomarker of oxidative DNA damage. This lesion induces G/C to T/A transversion mutation during replication of DNA.

Results.- Mitochondria are both a major source of oxidants and a target for their damaging effects. Accumulation of oxidative mtDNA lesions plays a major role in mitochondrial dysfunction in aging. Specifically, the age-associated mitochondrial DNA deletions focally accumulate in postmitotic brain and skeletal muscle. The rate of mitochondrial ROS generation in post-mitotic tissues is negatively correlated with longevity in animals. Decrease in bioenergy, organ dysfunction and apoptosis are consequences of mitochondrial dysfunction. Apoptosis occurring under conditions of augmented and persistent oxidative stress is known to be increased in age associated Alzheimer's disease or Parkinson.

Conclusion.- Caloric restriction which decreases mitochondrial ROS generation and oxidative damage to mitochondrial DNA is the only experimental manipulation capable of decreasing the rate of aging.

Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 159-169.

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROM oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biomoleküllere hasar vermektedir.^{1,2}

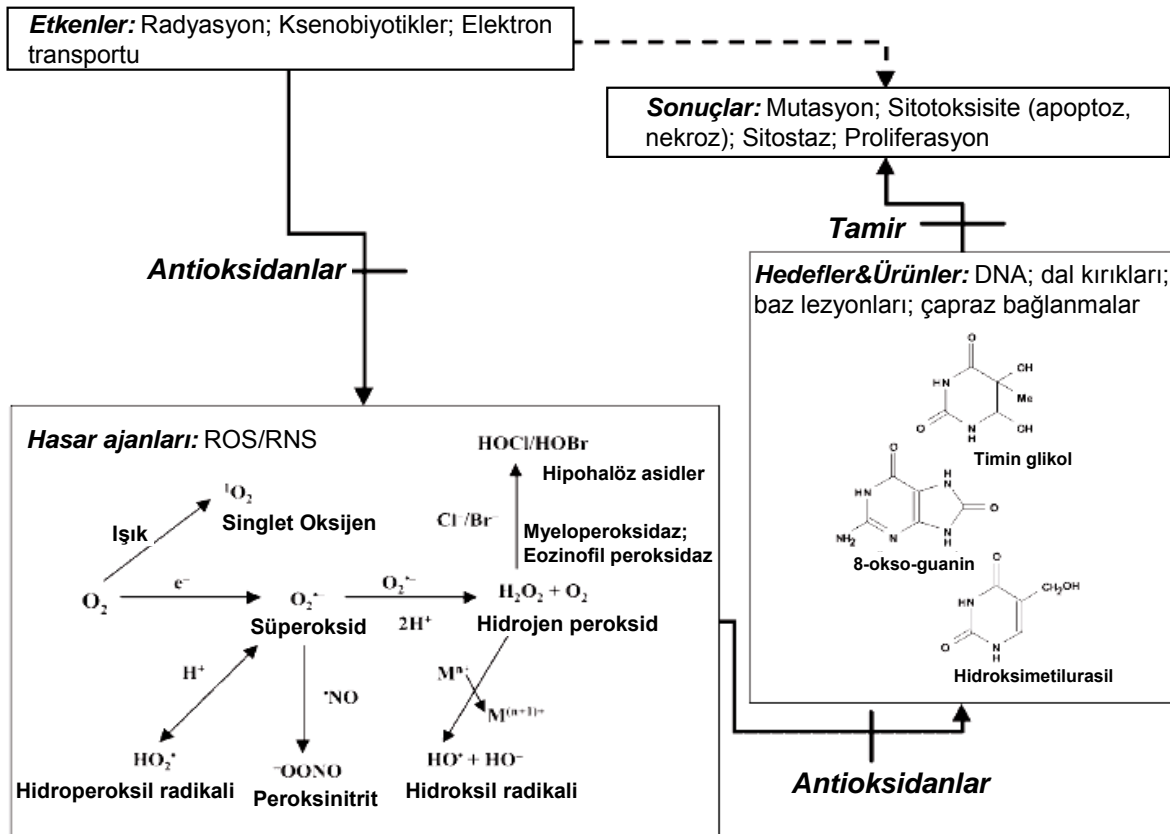
Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10³ kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür.³ DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8OHdG) olduğu gösterilmiştir.⁴ ROM oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır^{1,2} (Şekil 1).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir.^{1,2} Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10⁴ kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikörleri oluşmaktadır.³

DNA'da oksidatif hasar yapan başlıca etkenler: İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları ve TNF- α 'dır.³ DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır.⁵

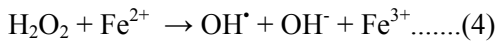
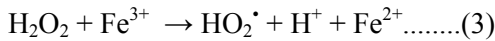
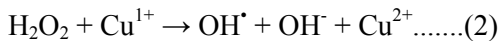
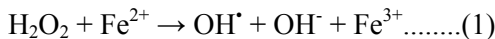
"Fenton Kimyası" hipotezinde OH \cdot radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur. O₂ \cdot^- gibi H₂O₂'de doğrudan DNA'da hasar yapmaz. OH \cdot radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması ge-

***Anahtar Kelimeler:** Oksidatif DNA hasarı, yaşlanma, 8-hidroksi deoksiguanozin; **Key Words:** Oxidative DNA damage, aging, 8-hydroxy deoxyguanosine; **Alındığı Tarih:** 02. Kasım 2004; Prof. Dr. Gülden Burçak, Uz. Dr. Gülnur Andican; İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul; **Yazışma Adresi (Address):** Uz. Dr. Gülnur Andican, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul
<http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2004v35/s4/044a1.pdf>



Şekil 1. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı

rekmedir. Reaktivitesi çok yüksek olan OH[•] radikalinin hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H₂O₂'in nukleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.



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

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Fe^{2+/3+} ve Cu^{1+/2+} iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı pro-

teinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H₂O₂'in hedefi haline getirmektedir.³ DNA'ya bağlı metal iyonları ile H₂O₂'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH[•] radikalleri, OH[•] radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH[•] radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir.⁶ Doku kültür ortamının Fe³⁺ ve Cu²⁺ iyon konsantrasyonunun artırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H₂O₂'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir çelatörlerinin (deferoksamin) kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir.⁷

DNA molekülüne bağlanarak transkripsiyon ve translasyonu etkileyen ribozomal proteinlerde çinko parmak yapıların bulunduğu ve bu yapılarda çinko yerine demirin bağlanması ile radikal oluşumunun arttığı saptanmıştır. DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir çelatörleri ve radikal temizleyicilerinin

birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür.³ OH^{*} radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen (¹O₂) çok daha seçicidir. ¹O₂ dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-hidroksi-guanin ve FAPyGuanin (FAPyG) oluşturmaktadır.⁸ Hücrede DNA ile birlikte bulunan Cu²⁺ iyonlarının bazı fenollerle reaksiyonlaşması ile ROM oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA baz-fenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir. İn vitro Cu²⁺ iyonları varlığında DNA hasarına neden olan fenol bileşikleri 2-hidroksiöstradiol, 2-metoksiöstradiol, dietilstilbestrol ve L-DOPA'dır. Bazı fenolik bileşiklerin bu lezyonların oluşumunda rol oynadıkları için karsinojenik oldukları öne sürülmektedir.⁹ Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik Ca²⁺ iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nukleusdaki Ca²⁺-bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca²⁺ çelâtorlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır.⁵ İn vivo her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Transisyon metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir.⁵

Reaktif nitrojen metabolitleri (RNM; NO₂, ONOOH, N₂O₃, HNO₂) DNA bazlarının nitrolanması veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO⁻ guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur.¹⁰ HOCl, DNA'da pürin oksidasyon ürünlerinden daha çok DNA bazlarını klorine ederek kloraminler ve halka klorasyonuna yol açar.¹¹ Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferel proteinleri-

ne ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil (LO^{*}) ve lipid peroksil (LOO^{*}) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine OH^{*} radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir. OH^{*} radikaline göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipid hidroperoksidler ve karbonil bileşikleri, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca lipid radikalleri de ¹O₂ gibi OH^{*} radikallerinden daha özgün davranır ve tercihen guanin bazına etki eder. Oluşan başlıca lezyon tek dal kırıklarıdır. Lipid oksidasyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarında metaller kritik rol oynamaktadır. LOOH etkisi ile DNA'da tek dal kırığı oluşumunda Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının katalitik etki yaptığı ve Fe²⁺'nin, Fe³⁺'den daha etkin olduğu öne sürülmüştür.¹² Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantin gibi O₂⁻ radikali oluşturan sistemler ve aktive nötrofiller hücre membranından kolaylıkla diffüze olan H₂O₂ oluşumuna neden olarak hücrelerde yaygın DNA hasarı yapmaktadır.^{3,5} Doku kültür ortamında belirli amino asitlerin, özellikle histidin bulunması DNA hasarını arttırmaktadır. Histidin olasılıkla metal iyonlarını bağlayarak hücreye taşınmalarını sağlamaktadır. Memeli hücre kültür ortamına katılan L-histidin H₂O₂ sitotoksitesini ve DNA'da çift dal kırılmalarını arttırdığı saptanmıştır. Histidin metal iyon bağımlı lipid peroksidasyonunu da arttırmaktadır.¹³ Hücreler ultraviyole ışığa (UV) maruz kaldığında da DNA hasarı oluşmaktadır. İki şekilde DNA hasarı meydana gelebilir. UV ışık H₂O₂'e etki ederek OH^{*} radikali meydana getirebildiği gibi doğrudan pürinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pürin dimerlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. İyonizan radyasyonun suyun homolizine neden olarak, OH^{*} radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir.¹⁴ DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki

ma özelliğine sahip olduğundan Fenton reaksiyonu ile oluşan OH[•] radikallerinden özellikle etkilenmektedir.^{1,3} Buna karşın Cu²⁺ iyonları özellikle DNA'nın guanin-sitozince zengin bölgelerine bağlanır ve guaninin H₂O₂ ile reaksiyonlaşması sonucunda guanin baz hasarı oluşmaktadır.¹⁸ Kromatindeki proteinler de radikallerin saldırısına uğramaktadır. Protein-türevli radikal ile baz-türevli radikalın bağlanması DNA-protein çapraz bağlanması (örneğin timin-tirozin) ile sonuçlanmaktadır. Kromatinin bozunmasına neden olan çapraz bağlanma DNA'nın onarım, replikasyon ve transkripsiyonunun bozulmasına neden olmaktadır.¹⁹

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu²⁺ iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8OHdG'dir. 8OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir "biomarker"i olarak kabul edilmektedir.^{1,2,20}

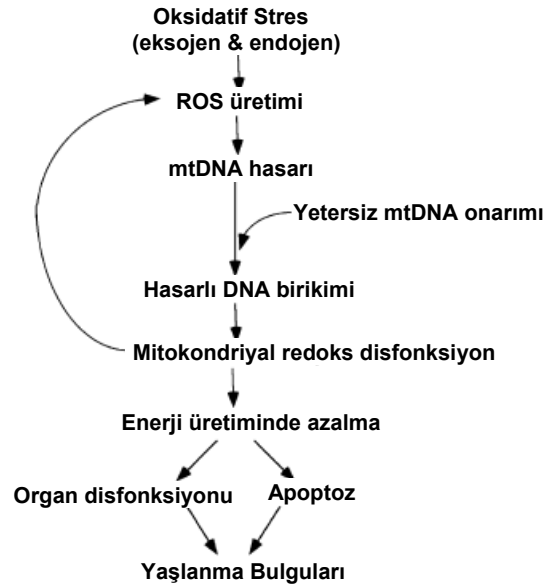
Oksidatif DNA hasarının yaşlanmada unimodal bir progeroid sendrom olan Alzheimer hastalığında, diabette, aterosklerozda, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün inflamatuvar hastalıklarda, hepatitte ve kanserde arttığını gösteren birçok araştırma bulunmaktadır.²¹⁻²⁷ Ataksi telenjiyektazi, Werner ve Cockayne gibi segmental progeroid sendromların patojenezinde (genomik instabilite sendromları) DNA onarım enzim defektleri rol oynamaktadır.^{22,28}

Mitokondriyal DNA'da Oksidatif Hasar ve Yaşlanma

Mitokondriyal DNA'da (mtDNA) oksidatif hasar ve bu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu ve mitokondrielerin yaşlanmada anahtar rol oynadıkları Miquel ve ark. tarafından 1980'de açıklanmıştır.²⁹ Günümüze dek yapılmış olan araştırmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzheimer hastalığı, diabet, kalp yetersizliği, sağırılık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalığı ve kanser gibi yaşlanma ile

sıklıkları artan hastalıkların mutasyona uğramış DNA içeren disfonksiyonel mitokondrielerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur.^{22,28}

Mitokondri, disfonksiyonu önemli negatif pleiotropik etkileri olan bir organeldir. Mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak membran potansiyeli azalır, ROM oluşumu artar (membran potansiyeli ROM oluşumunu düzenler), ATP sentezinde azalma olur, potansiyel toksisiteyi olan Ca²⁺ iyonlarının tutulumu azalır. Oksidatif hasara bağlı mutasyonel yük artarken koruyucu ve onarıcı proteinlerin azalması/hasarlanması mitokondrielerin hasar ve mutasyona yatkınlığını artırır ve dolayısı ile hücre yaşlanmayı hızlandırır.³⁰ (Şekil 2).



Şekil 2. Mitokondriyal ROM, oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma

Mitokondriyal DNA'nın korunması için son derece önemli olan nukleusdaki DNA'nın hasarlanması da mtDNA delesyonlarına yol açarak mitokondriyi etkilemektedir. Mitokondriyal DNA'nın transkripsiyonu yaşlanma ile keskin bir azalma gösterir. Mitokondri proteinlerinin sentezi azalır. Mutasyonlar mitokondri DNA'sının post-mitotik hücrelerdeki replikasyonunu bloke eder ve mitokondri turnover azalır. Sağlam mitokondri fonksiyon kaybını kompanse ederse de bu kompensasyon hasar riskini artırır. Mutasyonlarla gelen uzun süreli

irreversibl hasar birikimi yaşlanma sırasında ortaya çıkan biyoenerji azalması ve organ fonksiyonlarında zayıflama gibi olumsuz fakat fizyolojik değişikliklerin nedenidir.³¹

Yaşlanma ile mitokondrilerde büyüme, matriksde vakuolizasyon, kristalarda kısalma ve yoğun granüllerin kaybı gibi histolojik değişiklikler de görülür.³² Nörolojik, kardiyovasküler ve kassal fonksiyonlarda yaşlanma ile meydana gelen yetersizlikler ve sonuçta gelişen nörodejeneratif, kardiyovasküler ve kas hastalıklarında mitokondri fonksiyonlarındaki bozulma ve yetersizlik önemlidir.³³ Yaşlanma, genler, çevre ve yaşam hikayesinin etkileşimleri ile şekillenen multifaktöryel bir süreçtir. Bu süreç ile erişilen son aynıdır: Ölüm. Ancak, yaşanan süre, bu süre içindeki somatik dejenerasyonlar (intrinsik yaşlanma) ve hastalıklar her birey için aynı değildir. Özellikle mitokondrinin taşıdığı, maternal geçişli olan mitokondri DNA'sının taşıdığı genetik bilgi önemlidir.³⁴

Mitokondriyal DNA çift sarmal kapalı dairesel ve yaklaşık 16kb ağırlığında çok kompakt yapıya sahip olan, elektron transport zincirinin (ETZ) 60 protein komponentinden 13'ünü, 22 tRNA ve 2 rRNA molekülünü kodlayan intronları ve kodlamayan büyük sekansları bulunmayan bir moleküldür.^{22,35} mtDNA'nın ROM'ların başlıca oluşum yeri olan iç membrana yakınlıkları ve koruyucu histonlarının bulunmaması nedeni ile oksidasyon riski yüksektir. Protein ve lipidler kolay bir şekilde yıkılıp yeniden sentezlenebildikleri halde, DNA'daki oksidatif modifikasyonlar mutasyonlar ve diğer genomik instabilizasyonlardan dolayı kalıcı hale gelir.³³ Mitokondrilerde de oksidatif DNA lezyonları onaran etkin onarım mekanizmaları (BER ve NER) olduğu halde 8-oksodG düzeyinin mtDNA da nDNA dan çok daha yüksek olduğu saptanmıştır.³⁶ Örneğin, yaşlanma ile insan beyin mitokondri DNA'sında meydana gelen oksidatif hasarın nukleus DNA'sındaki hasara göre 10 kat daha fazla olduğu saptanmıştır.²¹ Mitokondriyal DNA onarımında (fare karaciğer, 8-oksoG glikozilaz aktivitesi) yaşlanma ile artış olduğu ve bu artışın nukleus DNA'sının onarımında olmadığı saptanmıştır. Bu bilgiler mitokondriyal DNA'daki oksidatif

hasar birikiminin esas nedeninin hasar oluşumundaki artış olduğunu göstermektedir.³⁵

Mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) elektron kaçağı sonucu oluşan serbest radikaller önce mitokondride ve sonra hücrede hasar oluşturmaktadır. Hasar ROM oluşumunu daha da arttırmaktadır. Bu kısır döngü belli bir yaştan sonra ölüm hızında görülen büyük artışı açıklamaktadır.^{37,38} ROM'un yaşam süresini belirleyip belirlemediği henüz bilinmemekle birlikte ilk olarak Harman tarafından³⁹ 1972'de öne sürüldüğü gibi ROM'ların yaşlanmanın fizyopatolojisinde önemli rol oynadıkları kesinlik kazanmıştır. ROM oluşumunun majör kaynağı olan mitokondriler aynı zamanda ROM'ların zararlı etkilerinin de önemli hedefidir.^{37,38}

Mitokondriyal oksidatif stres yaşlanma sırasında apoptozun intrinsik yolunun aktivasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Apoptoz veya programlı hücre ölümü çok hücreli organizmalarda normal gelişme ve homeostaz için gereklidir. Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda gereğinden fazla apoptoz olmaktadır.⁴⁰ Mitokondriyal GSH'nun oksidasyonu hücreleri apoptoza özellikle yatkın hale getirmektedir. Permeabilite transisyon porları açılır, membran potansiyeli azalır, sitokrom c serbestleşir. Sitokrom c'nin serbestleşmesi apoptozun işareti olarak kabul edilmektedir.⁴¹ Apoptoz ve yaşlanmanın birçok ortak yönleri bulunmaktadır. Apoptoz veya senesensi indükleyen p53 tümör supresör proteininin eksikliği kanserden dolayı mortalitenin artmasına ve yaşam süresinin kısalmasına yol açmaktadır.⁴² Hızlı replike olan kök hücrelerde mitokondriyal yaşlanma olmamaktadır. Mitokondriyal yaşlanma diferansiye olmuş somatik hücrelerin özelliğidir. 1907'de Minot tarafından "yaşlanmanın hücre diferansiasyonu için ödenen bedel olduğunu" açıklaması yapılmıştır.²⁹ Yaşlanmanın getirdiği olumsuz değişikliklerin özellikle görüldüğü beyin, iskelet kası ve kalp kası gibi diferansiye hücrelerden oluşan dokularda çok sayıda post-mitotik hücre bulunmaktadır. Oksidatif olarak modifiye bazılar normal bazal koşullarda post-mitotik dokularda bulunur. Bu hücrelerde mitokondri ve

mtDNA'nın turnover hızı düşüktür. Dokular arasında yaşlanmada görülen farklılıkların mtDNA'nın turnover hızındaki farklılıklar ile açıklanabileceği öne sürülmüştür.³⁷ Yaşlı insanların beyin, kalp ve karaciğer dokularında nDNA ve mtDNA 8-OHdG düzeylerinde orta derecede artış olduğu saptanmıştır. Diyafram kası ve beyinde mtDNA'daki 8-OHdG'nin yaşın fonksiyonu olarak biriktiği saptanmıştır.^{21,38,43} Mitokondriyel DNA da yaşlanma ile oluşan 8-OHdG'nin glutasyonun (GSH) oksidasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır.⁴⁴ Beyin oksidatif hasardan ve yaşlanmadan çok etkilenen bir organdır. Yaşlanma ile insan beyinde mtDNA'daki oksidatif hasarın genomik DNA hasarından 10 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Farelerde beyindeki oksidatif mtDNA hasarının motor koordinasyondaki kayıp ile ilişkili olduğu saptanmıştır.⁴⁵

Memelilerde özellikle post-mitotik ve yüksek derecede aerobik dokularda mtDNA'daki mutasyonların yaş ile arttığı gösterilmiştir.³⁸ Oksidatif hasarın, delesyonlar ve nokta mutasyonları ile orantılı olduğu saptanmıştır. Mitokondri biyogenezi ile ilgili LON proteaz ve mtDNA'nın korunması ile ilgili ERV1 genlerinde yaşlanma ile ilişkili olan azalmanın replikasyonu kontrol eden bölgedeki artmış olan nokta mutasyonları ile ilgili olduğu açıklanmıştır.⁴⁶ MtDNA delesyonlarının çeşitli kas dokularında (ekstraoküler, diyafram, iskelet), beyin, kalp akciğer ve karaciğerde yaşlanma ile arttığı ortaya konmuştur.^{33,47} Yaşlanma ile özellikle 4977 delesyonunda artış olduğu saptanmıştır.⁴⁸ Mitokondride ROM oluşumunu arttıran doksorubisinin kalp dokusunda mtDNA da delesyonları arttırdığı ve bir antioksidan olan ubikinolün bu delesyonları engellediği gösterilmiştir.⁴⁹

Sıçan ve güvercinlerin yaşam süreleri arasındaki farkın mitokondriyelerdeki ROM üretimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Post-mitotik dokunun mtDNA'sına (nDNA'ya değil!) saldıran ROM oluşumu ne kadar çok ise mutasyon birikim hızının ve yaşlanma hızının o kadar yüksek olduğu açıklanmış, oksidatif mtDNA hasarının (nDNA hasarı değil!) maksimum yaşam süresi ile ters korelasyonlu olduğu öne sürül-

müştür. Genellikle oksijen tüketiminin artması ile maksimum yaşam süresi potansiyelinin azaldığı belirtilmiştir. Somatik mtDNA mutasyonlarındaki birikim hızının kısa ömürlü hayvanlarda uzun ömürlülerden daha yüksek olduğu saptanmıştır.³⁸

İş yükü ve O₂ tüketiminin 4977 delesyonunu arttırdığı saptanmıştır.^{47,50} 4977 delesyonun yoğunluğunun beyin farklı bölgeleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Dopamin metabolizmasının (monoaminooksidaz ile ROM oluşumu) yüksek hızda olduğu kaudat, putamen, substansiya nigra bölgelerinde bu delesyonun yüksek oranda olduğu gösterilmiştir.⁵⁰ İskelet kasında lifler boyunca mtDNA delesyon birikiminin küçük alanlara lokalize olduğu ve bu birikimin kaslarda yaşlanma ile ortaya çıkan kütle kaybı ve fonksiyon kaybı (sarkopeni) ile ilişkili olduğu saptanmıştır.⁵¹ İskelet kası ve beyin gibi dokulardaki lokal delesyonların mitokondriyal füzyon (intermitokondriyel komplementasyon) ile genişleyebildiği gösterilmiştir.⁵² MtDNA mutasyonlarını genişleten mitokondriyal füzyonun kopmansasyon ve gen terapisi avantajları da bulunmaktadır.³⁷ Mitokondriyel DNA mutasyonları solunum zinciri komplekslerinden özellikle kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz) aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır. Bu kompleksler kısmen mitokondri genomu tarafından kodlanmaktadır. Kısmen mtDNA tarafından kodlanan sitokrom c oksidaz'ın eksikliği en sık görülen elektron transport defektidir.⁵³ Bu durumda nükleus mitokondri biyogenezi upregüle ederek ve süksinat dehidrogenaz aktivitesini artırarak mitokondriyel eksikliği kompanse etmeye çalışır. Sitokrom c oksidaz eksikliği ve süksinat dehidrogenaz hiperaktivitesi gösteren kas liflerinde mitokondriyel DNA'da delesyonlar saptanmıştır. Elektron sistem anormaliteleri, oksidatif hasar ve kas lifi atrofisinin mevcut olduğu bölgelerde mitokondriyel DNA delesyonlarının bulunduğu gösterilmiştir.⁵¹

Aterosklerozda da somatik DNA mutasyonunun önemli olduğu bilinmektedir fakat moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Son çalışmalar, aterosklerozun başlangıç ve

ilerleme safhalarında ROM'ların DNA hasarında rol oynadığını göstermektedir. Oksidatif DNA hasarı aterosklerotik lezyonlarda ve dokularda gösterilmiştir. Tavşanlar kolesterol ile beslendiğinde plaklarda oksidatif DNA hasarı ve apoptotik hücre ölümü olduğu ve DNA onarım enzimi ve p53 proteininin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Besinsel yağın azaltılması durumunda oksidatif DNA hasarının ve DNA onarım enzim ekspresyonunun büyük ölçüde azalmış olduğu saptanmıştır.²⁴ Aterosklerotik plaklarda saptanan apoptotik hücre ölümünün plak instabilitesi, rüptür ve trombüs oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır. DNA onarıldığında, genetik yapısı bozulmuş hücreleri uzaklaştırmak üzere fonksiyon yapan apoptoz azalacağından plak stabilitesinin artacağı ve aterosklerozun morbidite ve mortalitesinde önemli olan ve instabil plakların yol açtığı akut koroner sendromların azalacağı öngörülmüştür.⁵⁴

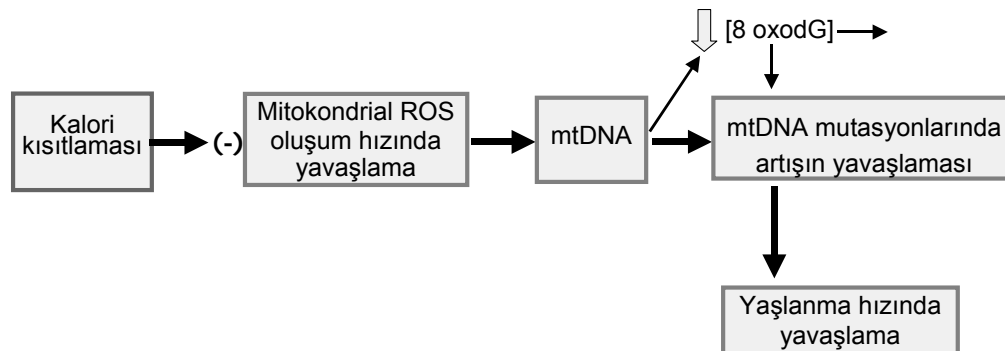
Bazı araştırmalarda fibroblastlar kullanılarak yaşlanma olayı incelenmektedir. Hızlı replike olan fibroblastın yaşlanması hücrenin replikasyon sayısındaki yani proliferasyon kapasitesindeki kayıp ile ilişkilidir. Fibroblastlar gibi bölünen hücrelerde her bölünmede telomer kısalması olması bölünme kapasitesini sınırlamaktadır. Bu nedenle normal hücreler ölümlüdür. Oksidatif DNA hasarı ve telomeraz aktivitesinde azalma telomer kısalmasına neden olarak hücre büyümesini durdurmaktadır.⁵⁵ Senesent fibroblastlarda DNA'nın daha fazla oksidasyona maruz kaldığı ve ortama spin tutucusu α -fenil-t-bütül nitron (PBN) katılmasının doza

bağımlı şekilde fibroblast hücrelerinin ömrünü uzattığı saptanmıştır.⁵⁶

Hücreler bölünmemeye başladıkları zaman telomer kısalması yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır. Bu nedenle, telomer kısalması hücresel yaşlanmanın nedeni olarak değil hücrenin senesense girişinin sinyali olarak kabul edilmektedir. Post-mitotik hücrelerde daha fazla telomer kısalması olmamaktadır. Telomer kısalmasını engelleyen telomeraz aktivitesine sahip olan kanser hücreleri ölümsüz hücrelerdir. Normal hücrelere telomeraz geni eklenmesi bu hücrelere ölümsüzlük kazandırmaktadır.⁵⁵ Organizmaların ortalama yaşam süreleri ile replikatif senesens arasında korelasyon saptanmıştır. Kısa yarı ömürlü organizmalara ait fibroblastların in vitro yaşam sürelerinin daha kısa olduğu saptanmıştır. Yaşlı bireylere ait fibroblastların da replikasyon kapasitelerinin sınırlı olduğu gösterilmiştir.⁵⁷

Kalori kısıtlaması maksimum yaşam süresini uzatan tek deneysel manipülasyondur. Uzun süreli kalori kısıtlaması, esansiyel besinler yeterli olmak kaydı ile, ortalama ve maksimum yaşam sürelerini uzatır, yaşlanma sürecini yavaşlatır, yaşa bağlı olarak görülme sıklığı artan hastalıkları (kanserler, immun bozukluklar, diyabet, katarakt, hipertansiyon, böbrek yetmezliği) geciktirir. Kalori kısıtlaması ile daha uzun ve daha sağlıklı yaşaması sağlanan hayvanlarda mtDNA'da daha az mutasyon birikimi olduğu saptanmıştır.³⁸ (Şekil 3).

Kalori Kısıtlaması Yapılan Denekler



Şekil 3. Kalori kısıtlamasının yaşlanma üzerine etkisi

Tiyol gruplu antioksidanlar, C ve E vitaminleri, Ginkgo biloba ekstraktı ve Egb 761 tarafından yaşlanma ile mtDNA'da meydana gelen oksidatif hasarın ve mitokondriyal glutasyon oksidasyonunun engellenebildiği saptanmıştır. Egb 761 ekstraktının beyin ve karaciğer mitokondrilerinde yaşlanma ile meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri engellediği saptanmıştır.⁵⁸ Kenetlenmeyi bozan proteinlerin mitokondrilerde ROM oluşumunu azaltarak genel bir koruma sağladıkları gösterilmiştir.³⁸ Transgenik ve knockout deneysel hayvan modelleri, ETZ proteinleri, mitokondriyal antioksidanlar ve onarım enzimleri gibi moleküllerin yaşlanmadaki rollerinin araştırılmasında önerilmektedir.³⁷

Kaliteli ve uzun yaşam organizmanın bakım ve onarım mekanizmalarının doğru ve etkin çalışmalarını gerektirmektedir. Hüresel homeostazın sağlanabilmesi için genomik, mitokondriyal ve ribozomal integrite/stabilite gerekmektedir. Birçok ribozomal proteinin ekstraribozomal fonksiyonları ortaya çıkmaktadır. Bakım ve onarım mekanizmalarını kodlayan çeşitli genlerden oluşan ve yaşam süresinin sigortası olan kompleks bir vitagen şebekenin yaşlanma ile gerontogen şebekeye dönüştüğü ve bu nedenle organizmanın homeodinamik özelliğinde yetersizlik olduğu öne sürülmüştür. Vitagenlerin bakımları ve etkinliklerinin korunması ile yaşlanmanın ve yaş ile ilişkili hastalıkların geciktirilebileceği öne sürülmektedir.⁵⁹

ÖZET

Tüm organizmalarda, normal metabolizma ve çevresel ajanlara maruz kalma sonucunda reaktif oksijen metabolitleri (ROM) oluşur. ROM'un DNA'ya etkisi sonucunda çok çeşitli DNA hasar ürünleri oluşur. Günümüzde 8-hidroksi deoksiguanozin (8OHdG) oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. En fazla oluşan oksidatif DNA lezyonlarından biri olan 8OHdG, DNA replikasyonu esnasında G/C, T/A transversion mutasyonuna neden olur.

ROM'un hem başlıca oluşum yerleri hem de hasar yapıcı etkilerinin en önemli hedefleri

mitokondrilerdir. Yaşlanma ile biriktiği saptanan oksidatif mitokondriyal DNA (mtDNA) lezyonları mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun başlıca nedenidir. Özellikle yaşla artan mtDNA delesyonları post-mitotik beyin ve iskelet kasında birikime uğramaktadır. Post-mitotik dokularda mitokondride ROM oluşum hızının hayvanlarda yaşam süresi ile ters ilişkili olduğu saptanmıştır. Mitokondri disfonksiyonu biyoenerjide azalma, organ disfonksiyonu ve apoptoz ile sonuçlanır. Şiddetli ve kalıcı oksidatif stres varlığında gerçekleşen apoptoz yaşlanma ile insidensi artan Alzheimer Hastalığı ve Parkinson gibi hastalıklarda artmaktadır.

Mitokondriyal ROM oluşumunu ve DNA hasarını azaltan kalori kısıtlaması yaşlanma hızını azaltan tek deneysel manipülasyondur.

KAYNAKLAR

1. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214.
2. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004; 26: 533-542.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
4. Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1419-1421.
5. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9-19.
6. Milligan JR, Ward JF. Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 1994; 137: 295-299.
7. Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhom L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1013-1022.
8. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531: 5-23.
9. Li Y, Trush MA. Reactive O₂-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a

- copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 1994; 54: 1895S-
10. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM* 1999; 222: 246-252.
 11. Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Hypochlorous acid-induced base modification in isolated calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 1240-1246.
 12. Yang MH, Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 225-236.
 13. Sestili P, Guidarelli A, Cattabeni F, Murray D, Cantoni O. AG8 cells, which are highly resistant to H₂O₂, display collateral sensitivity to combination of H₂O₂ and L-Histidine. *Carcinogenesis* 1996; 17: 885-888.
 14. Simic MG. DNA Markers of oxidative processes in vivo: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1994; 54(suppl): 1918s-1923s.
 15. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 75: 331-342.
 16. Winyard PG, Perrett D, Blake DR, Harris G, Chipman JK. Measurement of DNA oxidation products. *Anal Proceedings* 1990; 27: 224-227.
 17. Douki T, Ames BN. An HPLC-EC assay for 1, N²-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other α,β -unsaturated aldehydes. *Chem Res Toxicol* 1994; 7: 511-518.
 18. Rodriguez M, Drouin R, Holmquist GP, O'Connor TR, Boiteux S, Laval J, Doroshov JH, Akman SA. Mapping of Cu/H₂O₂-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 17633-17640.
 19. Altman SA, Zastawny TH, Randers-Eichhom L, Cacciuttolo M, Akman SA, Dizdaroglu M, Rao G. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 897-902.
 20. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443: 37-52.
 21. Mecocci P, McGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 1993; 34: 609-616.
 22. Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American* 1997; 8: 40-47.
 23. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-445.
 24. Martinet W, Knaapen MW, De Mayer GR, Herman AG, Kockx MM. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res* 2001; 88: 733-739.
 25. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine a marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett* 1994; 348: 131-138.
 26. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Jokota J, Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994; 54: 3171-3172.
 27. Farinati F, Cardin R, Degan P, Ruge M, Di Mario F, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998; 42: 351-356.
 28. Martin GM, Oshima J. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* 2000; 408: 263-266.
 29. Miquel J, Economos C, Fleming J, Johnson JE. Mitochondrial role in cell ageing. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-591.
 30. Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3731-3738.
 31. Liang F-Q, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003; 76: 397-403.
 32. Macieira-Coelho A. Cancer and aging. *Exp Gerontol* 1986; 21: 483-495.
 33. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 165-170.
 34. Holmes GE, Bernstein C, Bernstein H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: A review. *Mutation Res* 1992; 275: 305-315.
 35. Stevnsner T, Thorslund T, De Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exper Gerontology* 2002; 37: 1189-1196.
 36. Bohr VA, Dianov GL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 1999; 81: 155-160.
 37. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1-8.
 38. Barja G. Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 397-411.
 39. Harman D. The biological clock: The mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 145-147.

40. Kanan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-163.
41. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: A possible mechanism for apoptosis with age. *Am J Physiol* 2002; 282: 423-430.
42. Ferbeyree G, Lowe SW. The price of tumor suppression? *Nature* 2002; 415: 26-27.
43. Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 1023-1029.
44. Garcia de la Asuncion J, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10: 323-328.
45. Pallardo FV, Asensi M, Garcia de la Asuncion J, Anton V, Lloret A, Sastre J, Vina J. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor coordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* 1999; 29: 617-623.
46. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 1999; 285: 1390-1393.
47. Arnheim N, Cortopassi G. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat Res* 1992; 275: 157-167.
48. Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 772-779.
49. Adachi K, Fujiura Y, Mayumi F, Nozuhara A, Sugiu Y, Sakanashi T, Hidaka T, Toshima H. A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 945-951.
50. Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nature Gen* 1992; 2: 318.
51. Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J* 2001; 15: 322-332.
52. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi J. Intermitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 2001; 7: 934-940.
53. Lee CM, Lopez ME, Weindruch R, Aiken JM. Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 964-972.
54. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003; 543: 67-86.
55. Von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblast: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995; 220: 186-193.
56. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4337-4341.
57. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1401-1414.
58. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 2000; 49: 427-435.
59. Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res* 2001; 26: 739-764.