

DNA Çift Zincir Kırıklarına Neden Olan Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Ajanlar

Received : 03.08.2015

Revised : 11.11.2015

Accepted : 14.01.2016

Didem Oral*, Belma Koçer-Gümüşel*, Pınar Erkekoğlu*

Giriş

Genomun stabilitesi, DNA hasar kontrol noktaları, karmaşık bir onarım mekanizması, ve hasar toleransı ile sağlanmaktadır¹. Tüm canlı organizmalar hipoksi, oksidatif stres, besin yoksunluğu, ısı şoku, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar gibi genomun stabilitesini değiştirebilen ve sonuçta kalıcı DNA hasarına neden olan birçok çevresel etmene maruz kalır². DNA hasarı başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın ve yaşlanmanın temel nedenidir. Genom instabilitesi, pek çok kanser türünde gözlenen bir durumdur ve epigenetik değişimlerin de genom instabilitesine katkıda bulunduğu bilinmektedir³.

DNA bütünlüğünü spontan gelişen reaksiyonlar, hücre metabolizma ara ürünleri [örneğin solunum sonrası oluşan reaktif oksijen bileşikleri (ROS), lipid peroksidasyon sonrası oluşan aldehitler ve diğer bileşikler, östrojen ve kolesterol metabolitleri, protein oksidasyonu sonrası oluşan reaktif karbonil türleri] ve ekzojen fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar tarafından bozulabilir. Spontan reaksiyonlar, özellikle hidroliz reaksiyonları sonucu DNA'da abazik alanlar oluşturur ve deaminasyona yol açabilir⁴. Hücredeki metabolizma ara ürünleri, reaktif oksijen (ROS) ve azot (NOS) türleri, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu, endojen alkileyici ajanlar ve östrojen ve kolesterol metabolitleri oluşumuna yol açar. ROS ve RNS oluşumu, DNA da çeşitli tek zincir kırıklarına (SSB), çift zincir kırıklarına (DSB) ve yetmişten fazla oksidatif baz ve şeker ürünlerinin oluşumuna neden olur⁵. Ekzojen ajanlar ise, hem SSB, hem de DSB'na yol açabilir¹.

DNA'da görülen lezyonlar ve mutasyonlar hücresel çoğalmasında "başlatıcı etki" yaratabilir ve yeni kromozomal düzenlemelere de neden olduklarından dolayı hücre canlılığı ve genomik stabilite için tehdit unsuru olabilir⁶.

* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, F.Toksikoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye Ankara 06100 Türkiye

° Yazışma Yapılacak Yazar: E-posta: erkekp@yahoo.com

DNA'da Meydana Gelen Hasarlar

DNA'da görülen başlıca hasarlar şunlardır⁷:

- a. Baz hasarları: depurinasyon, deaminasyon (sitozinin urasile, adeninin hipoksantine dönüşümü), tautomerizm, baz analogları ile yer değişimi; timin-timin dimeri,
- b. Nükleotid hasarları
- c. DNA zincir kırıkları: SSB ve DSB
- d. Çapraz bağ oluşumu: Aynı veya zıt ipliklerdeki bazlar arasında veya DNA ile protein (örneğin, histonlar) molekülleri arasında oluşabilir.

DNA Çift Zincir Kırıklarının Oluşumu

Endojen veya ekzojen kaynaklı olarak meydana gelen DSB, onarılmadığında hücre ölümüne ya da genomik instabiliteye yol açtığı için en tehlikeli hasar tipi olduğu düşünülmektedir. Somatik hücrelerde meydana gelen DSB, kanserojen tümörlerin oluşumuna neden olurken; reproduktif hücrelerde kalıcı zararlı mutasyonlara veya kromozomal anomalilere yol açmakta; gelişim sürecinde ise gelişimsel anomalilere neden olmaktadır⁷. Yapısal kromozomal hasar oluşturan ajanlara “klastojen” adı verilir. Endojen ve ekzojen nedenlerle oluşan DSB'ler Tablo 1'de gösterilmiştir.

TABLO 1

Endojen ve Ekzojen kaynaklı oluşan DNA çift zincir kırıkları⁹

Endojen kaynaklı DSB'ler	Ekzojen kaynaklı DSB'ler
Transkripsiyon ve replikasyon sırasında Topoizomerez 2 aracılığı ile oluşan geçici DSB'ler	ROS ve ionize radyasyon kaynaklı SSB'lerinin üstüste gelmesi sonucu oluşan DSB'ler
R-Luplar nedeniyle oluşan DSB'ler	Topoisomerez - interaktif kimyasal ajanlara maruziyet ile oluşan DSB'ler
Aşırı transkripsiyon sonucu oluşan DSB'ler	DNA - DNA çapraz bağlarının ve diğer DNA hasarı onarımları sırasında ksenobiotiklerin etkisi ile oluşan DSB'ler
SSB'nin neden olduğu DSB'ler	Hücrel homeostazın ekstrasnükleer bozulması sonucunda oluşan DSB'ler
Apoptoz sırasında oluşan DSB'ler	Ekzojen olarak meydana gelen hücre ölümü sırasında oluşan DSB'ler
DNA onarım mekanizmaları sırasında meydana gelen spontan DSB'ler	ROS ve NOS'un doğrudan neden olduğu DSB'ler

DSB: DNA çift zincir kırığı; **NOS:** Reaktif azot bileşikleri; **ROS:** Reaktif oksijen bileşikleri;
SSB: DNA tek zincir kırığı

Endojen Nedenlerle DNA Çift Zincir Kırıklarının Oluşumu

Endojen DSB, DNA onarımı, transkripsiyon, replikasyon ve rekombinasyon sırasında ve apoptoz sırasında meydana gelebilir⁸:

- a. DSB oluşumu en sıklıkla gen transkripsiyonu ve DNA onarımının kolaylaştırılması için DNA süper sarmalının topoizomeraz II enzimi ile çözülmesi sırasında ortaya çıkabilir⁹.
- b. Replikasyon kaynaklı DSB, replikasyon çatalının durmasına neden olan anormal ikincil DNA yapıları, büyük lezyonlar, polimeraz bloke edici oksidatif lezyonlar, abazik alanlar, kimyasal ajanlara veya infrared ışınlarına (IR) maruziyet sonucu oluşan ara zincir çapraz bağlanmaları veya transkripsiyon komplekslerinin ve belirli DNA bağlayıcı proteinlerle ayrılması sonucunda meydana gelebilir¹⁰. Örneğin, herhangi bir etkenle replikasyonun durması sonucunda replikasyon çatalı gerileyebilir ve yeni sentezlenen DNA öncü zincirin aktive olmuş 3' ucunun kalıp zincirin 5' ucuna tutunarak tamamlayıcı zincirden farklı bir yere bağlanmasıyla yanlış eşleşme meydana gelir. Bunun sonucunda ortaya çıkan Holliday bağlantılarının ayrılması ile DSBler oluşabilir⁹.
- c. Transkripsiyon ve R-lup bağlantılı DSB oluşumu: Yapılan pek çok çalışma ile genomun yoğun transkripsiyona uğrayan bölgelerinde daha yüksek oranda mutasyon olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonlardan bazıları bu bölgelerde DSB oluşumu ile gerçekleşir. Ayrıca, yoğun transkribe olmuş bölgelerdeki DSBlerin de kendiliğinden oluştuğu görülmektedir. Transkripsiyon ve replikasyon esnasındaki DNA'da baloncuk oluşumu ile DNA heliksindeki çözülmeler, DNA da topoizomerazlarca hafifletilen süper sarmalda strese neden olmakta ve bununda DSBye yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca R-lupları olarak bilinen ko-transkripsiyonel RNA-DNA melez yapılarının oluşumundaki artışla bağlantılı olarak belirli RNA-işleyici faktörlerin kaybı DSB ve DNA hasarı ile sonuçlanabilir. R-lup yapıları aracılığı ile gerçekleşen DNA kırıkları ve genomik instabilitenin moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır¹¹.

Hücresel Homeostazın Çeşitli Ekzojen Ajanlarla Bozulması Sonucu DNA Çift Zincir Kırıklarının Oluşumu

Çeşitli ekzojen faktörlerin neden olduğu Ca⁺ bağımlı endonükleazların aktivasyonu, ekstrasellüler Ca⁺ un hücre içine alınımında artış, hücre içi tampon sistemlerinde yetersizlik ya da akut yaralanma ve hücre ölümü sonucunda hücre içi Ca⁺ miktarının artışı, kromatinlerde ve kromatidlerde kırılmalara neden olabilmekte ve sonuç olarak DSB meydana gelebilmektedir¹².

DNA'da zincirler arası çapraz bağlanmalar, replikasyon ve transkripsiyonun bloke olmasına ve aynı zamanda onarım esnasında DSB'ye yol açabilir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda psöralenin çapraz bağlanması ile oluşan hasarın tamir sırasında DSBlerin oluştuğu gözlenmiştir¹³. DNA-DNA zincirler arası çapraz bağlanmaları veya büyük yapısal bükülmeler gibi kompleks DNA hasarının eksizyonu sırasında her iki DNA zincirinde onarımı gerektiğinden dolayı onarım sırasında çift kırıklar oluşabilmektedir⁹. Sisplatin, busulfan, mitomisin C, 8-metoksipsöralen gibi bifonksiyonel alkilleyici ajanlar ve UVA'nın DNA-DNA çapraz bağlanmalarına ve çift kırıklarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda endüstriyel ajanlardan toluen diisoksiyanat, metilen-4-4'-difenildiisoksisyanat ve aromatik aminlerin hidroliz ve dekarboksilasyon ürünleri bifonksiyonel alkilleyici özellikte olup, DNA-DNA çapraz bağlanmalarına ve çift zincir kırıklarına yol açtıkları gösterilmiştir⁹. Diğer taraftan, çoklu hasarlı alanların eksizyon/insizyon yoluyla onarımı sırasında DBS oluşabilir. Bu alanlar tipik olarak IR, UVC, UVA, genotoksik ajanlar, radyomimetikler ve alkilleyici ajanların indüksiyonu ile meydana gelen okside pürin ve pirimidin bazlarını, abazik alanları ve tek zincir kırıklarını kapsamaktadır. Bakteri ve memeli hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar çoklu hasarlı alanların onarımı sırasında lezyonlar arası uzaklığın ve onarım enzimlerinin yeteri kadar sentezlenip sentezlenmemesinin DSB oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir¹⁴.

Ekzojen Kaynaklı DSB'lere Neden Olan Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Ajanlara Örnekler ve Etki Mekanizmaları

1. Fiziksel Ajanlarla Oluşan Çift Sarmal Kırıklar

a. *İyonize edici radyasyon kaynaklı DSB oluşumu:* İyonize radyasyona maruziyet sonucunda oluşan DNA lezyonları abazik bölgelerin oluşumu, okside şeker ve okside baz oluşumu, SSB ve DSB oluşumu, zincir içinde veya tamamlayıcı DNA zinciri arasında veya DNA ile çevreleyen proteinler arasında çapraz bağların şeklinde sıralanabilir^{15,16}. İyonize radyasyondaki en önemli etki hidroksil (-OH) radikalleri aracılığı ile olmaktadır. Hücresel suyun düşük lineer enerji transferinin radyolizisi ile oluşan ·OH radikalleri hücre ölümlerinin ve DNA zincir kırıklarının üçte ikisinden sorumludur¹⁷.

b. *Infrared (IR) nedeniyle DSB oluşumu:* IR indüksiyonu ile doğrudan DNA üzerinde ya da DNA etrafındaki suyun radyolizisi aracılığı ile radikal oluşumu görülür. Takiben, oluşan radikaller DNA'nın şeker fosfat omurgasının yapısını bozar ve bunun sonucunda DSBler meydana gelir¹⁵. Ayrıca,

IRden gelen partikül ve protonlar, doku içerisindeki atomlarla etkileşime girecek şekilde dokulara penetre olur ve kromozomal DNAda da doğrudan veya dolaylı şekilde kırıklara yol açar. Doğrudan yolda DNA zincirinin yüksek enerjili partikül veya protonlarla çarpışması sonucunda fosfodiester omurgasındaki kırılmalar oluşur veya daha yaygın olarak IR'in DNA çevresindeki su moleküllerini parçalaması ile oluşan hidrojen ve ·OH radikallerinin etkisi ile DNA kırıkları meydana gelir. Kısa ömürlü ancak oldukça reaktif olan bu ·OH radikalleri yakınındaki DNA ile etkileşerek SSB oluşumuna yol açar ve daha sonra bu kırıklar DSB'ye dönüşebilir^{17,18}. Dolaylı yolda ise, IR etkisi ile suyun radyolizisi ile oluşan ROS'un neden olduğu okside baz ve baz alanlarının kaybının onarımı sırasında, her iki DNA zincirinde meydana gelen SSB ve takiben DBS oluşumu görülür. Normal koşullarda oluşan 1-2 nükleotidlik DNA boşlukları DNA polimeraz ve DNA ligaz III ile doldurulur; ancak kümelenmiş oksidatif lezyonların baz eksizyonu ile onarımı sırasında her iki zincirde de SSBler oluşabilir ve bu kırıklar DSB'ye dönüşebilir¹⁸.

2. Kimyasal Ajanlarla Oluşan Çift Sarmal Kırıkları

a. Radyomimetik bileşikler: Bu bileşiklerinki mekanizmaları ionize radyasyona benzediği için "radyomimetik antibiyotikler" olarak adlandırılırlar^{18,19}. Bu bileşikler, serbest radikal oluşumuna yol açarlar. Oluşan radikaller her iki DNA zincirindeki deoksiribozun yapısını bozar ve DSB oluşumunu indükler. Tüm radyomimetik ajanların mekanizmaları DNA'daki deoksiribozun oksidasyonuna dayanır. Bleomisin ve neokarzinostatin bu şekilde etki gösteren radyomimetik antibiyotiklere örnektir^{18,19}.

b. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar: Birçok deneysel araştırma sonucunda çeşitli anti-tümör ilaçların (neokardinstatin, kalisiheamisin, esperamisin ve kedarsidin) biradikal oluşturması ve bu biradikallerin deoksiriboza eklenmesi sonucunda DSB oluşumunda indüksiyona yol açtığı görülmüştür^{9,19}. Adriamisin ve etaposid gibi antikanser ilaçların topoizomerez II-DNA kompleksini bloke etmesi sonucunda DNA zincirleri ayrılır; enzimin tirozin rezidülerine bağlanır ve DNAda SSB ve DSB oluşumu indüklenir²⁰.

c. Ağır Metaller

o Metilciva: Civalı bileşikler doğal ve antropojenik kaynaklardan atmosfer tarafından emilir ve daha sonra su buharı ve yağmurlar aracılığı ile toprağa karışırlar. Metilciva özellikle nörotoksik etkili bir ajan olup etkisini serebellar granül hücreler üzerinde göstermektedir. Metilcivanın toksik etki mekanizmaları sırasıyla; oksidatif stres, kalsiyum homeostazının bozulması, prosinaptik ve postsinaptik glutamat düzeylerinde değişme, anormal gen

ekspresyonu, ve epigenetik modifikasyonlar olarak bilinmektedir. Nöronların antioksidan savunmalarında yetersizlik ve ROS oluşumu hücre içi oksidatif/redüktif dengenin bozulması ile sonuçlanır. Serebral granül hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar metilciva kaynaklı DNA kırıklarının apoptoza yol açabileceğini göstermektedir. Metilcivanın neden olduğu lipid peroksidasyonundaki artışın DNA, RNA ve proteinin hasarına yol açabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak C6 glioma hücrelerinde ve kemirici embriyogenik fibroblastlarında yapılan çalışmalar metilciva maruziyeti takiben artan ROSun DSB hasarı ile sonuçlandığını göstermiştir^{21,22}.

d. Arsenik: Arsenik (As) madencilik, elektronik üretimi ve ziraat gibi antropojenik yolla da çevreye yayılabilen ve yer altı sularında da yüksek miktarda bulunan bir ağır metaldir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup I karsinojen olarak tanımlanmıştır ve arseniğin oksidatif DNA hasarına yol açtığı, DSB ve ve DNA çapraz bağlanmaları yoluyla sitotoksik ve genotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir^{23,24}. Xie ve ark. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada arseniğin fotal akciğer fibroblastlarında ve epitel hücrelerinde DSB'ye neden olduğu Comet ve gamma-H2AX fokus yöntemleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca, arsenik uygulaması ile fibroblastlarda kromozomal aberasyonlar, anöploidi ve mitokondriyel anomaliler de gözlenmiştir²⁴.

e. Asbest: Asbest, endüstride kullanılan ve solunum yoluyla maruziyette mezotelyomaya neden olan altı farklı silikat yapısından oluşan ince fibröz kristal yapısında bir bileşiktir. Asbestin özellikle demir şelatörlerinin varlığında DSB'ye neden olduğu gösterilmiştir. Jiang ve ark.(2008)'nin yaptığı bir çalışmada asbest fiberlerinin MeT-5 A ve HeLa hücrelerinde ·OH radikallerinin oluşumuna neden oldukları ve H₂O₂ artışı ile yalnızca sitoplazmaya değil hücre çekirdeğine kadar ulaşarak sekans spesifik transversiyonlar (G:C) ve DSB'na neden oldukları gösterilmiştir. Asbest türlerinden en çok krokidolit ve amositin DSB'na neden olduğu, krisotilin ise DSB'na yol açmadığı belirlenmiştir²⁵. Primer küçük hava yolu epitel hücreleri ve kanser A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada asbest (krokidolit), silika ve titanyum dioksitin DSB üzerine etkileri incelenmiştir. Asbestin her iki hücre tipinde de silika ve titanyum dioksitten daha çok DSB'na neden olduğu ve oluşturduğu DSB'nın ve sitotoksitenin normal hücrelerde daha belirgin bir şekilde ortaya çıktığı belirlenmiştir. Sonuçta, asbestin silika ve titanyum dioksitten daha yüksek bir karsinojenik potansiyelinin olduğu ve özellikle primer akciğer hücre kültürlerinde genomik instabiliteye neden olduğu belirtilmiştir²⁶. Krisotil tipi asbest fiberi uygulanan ışığa duyarlı DNA onarımı-eksik xrs-5 Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücre hattı ve yabancı tip CHO hücreleri ile yapılan bir çalışmada, bu asbest fiberine 24 saat ma-

ruziyet ile xrs-5 CHO hücrelerinde daha yüksek miktarda DSB oluştuğu belirlenmiştir²⁷. Diğer taraftan, iş yerinde asbeste maruz kalan işçilerde, lökositlerde görülen DSB'nın maruz kalmayan işçilere göre 4 kat yüksek olduğu belirlenmiştir²⁸.

f. Benzen: Benzen bilinen en tehlikeli insan karsinojenlerindedir ve benzene mesleki olarak veya endüstriyel kullanım sonucu temas mümkündür. Benzenin asıl hedef organı kemik iliği olup hematoksisiteye ve lösemiye neden olmaktadır. Benzen oksit, fenol, hidrokinon bilinen benzen metabolitleri redoks zincirine etki ederek oksidatif DNA hasarı ve sinyal yollarının değişmesine neden olan aşırı ROS üretimine neden olurlar²⁹. Aynı zamanda DNA'da topoizomeraz II enzimini inhibe ederek çift zincir kırıkları meydana getirdikleri bilinmektedir.

Karaciğerde CYP2E1 enzimi ile metabolize olan benzen metabolitleri kan yoluyla vücuda yayılır ve kemik iliğinde peroksidaz aracılığı ile ikinci kez metabolize olur. Burada katekol ve hidrokinon sırasıyla o ve p -benzokinona dönüşür ve özellikle p-benzokinonun miyelotoksik etkisi oldukça güçlüdür. Takiben, p-benzokinon proteinlere ve DNaya bağlanır; redoks zincirinde glutatyonla konjuge edilir; intraselüler ROS üretiminde artışa ve sonuç olarak genotoksik etkiye neden olurlar. Artan ROS sonucunda DNA baz lezyonları abazik alanlar, DNA-protein çapraz bağlanmaları, şeker lezyonları, SSB ve DSBler oluşur. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar DSBlerin ya doğrudan ROS atakları ile ya da topoizomeraz II enziminin inhibisyonu ile sonucunda meydana geldiğini göstermiştir³⁰.

g. Ftalatlar: Ftalatlar çevrede en yaygın bulunan endokrin bozuculardır. Kemirici karaciğerinde peroksizom proliferasyonuna neden olurlar. En çok maruz kalınan ftalat türevi di(2-etilhekzil)ftalat (DEHP)dır. İnsanlarda ve kemiricilerde oral yoldan alınan DEHP bağırsaklarda pankreatik lipazlarca mono(2-etilhekzil) ftalata (MEHP) ve daha sonra da oksidatif metabolitlerine metabolize edilir. Takiben, glukuronat ve sülfat konjugatları idrar ve feçesle atılır³¹.

Ftalatların genotoksik, karsinojenik ve mutajenik etkisini araştıran pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır³². DEHP ve diğer çok sayıda ftalatın kemiricilerde peroksizom proliferasyonu ve hepatokarsinogeneze yol açtığı gösterilmiştir^{33,34}. Hepatokarsinogenezde peroksizom proliferasyonu sonucu artan oksidatif stres ve takiben ortaya çıkan genotoksik etkinin yattığı belirtilmiştir³⁵⁻³⁷. Wang ve ark. (2015)'nin HEK-293 hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, DEHP'in oksidatif strese neden olarak DSB oluşturduğu Comet yöntemi ile tespit edilmiştir³⁸. Diğer taraftan, Salator ve arkadaşlarının 2015 yılında bakır-ftalat kompleksi (1,10-Phenanthroline) ile

yaptıkları çalışmada, bu bileğin SKOV3 insan yumurtalık kanseri hücrelerinde DNA DSB oluşumlarını indükleyen hücre içi ROS aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir³⁹.

h. Okratoksin A (OTA): Okratoksin A (OTA) çoğunlukla tarım ürünlerinde bulunan *Aspergillus ochraceus* mantarı tarafından oluşturulan bir toksindir⁴⁰. Kemiricilerle yapılan pekçok çalışma sonucunda OTA'nın böbrek tümörlerine neden olabileceği görülmüştür ve bundan dolayı da, IARC tarafından Grup IIB karsinogen olarak sınıflandırılmıştır^{41,42}. OTA'nın genotoksik etkisini nasıl gösterdiği hala tartışmalıdır. Dokularda hem SSB, hem de DSB'ye neden olduğu tespit edilmiştir^{43,44}. Diğer taraftan, OTA'nın böbrekte DSB'nin bir göstergesi olan H2AX ekspresyonunun doz-bağımlı olarak artırdığı görülmüştür⁴⁵.

3. Biyolojik Ajanlarla Oluşan Çift Sarmal Kırıkları

Ülseratif kolit, viral hepatit, prostatit, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, parazitik hastalıklar ve diğer çeşitli kronik enflamatuvar hastalıklar intrasellüler oksidatif dengeyi bozarak, oksidatif strese ve takiben DNA lezyonlarına, onkogen aktivasyonuna veya tümör supresör genlerin inaktivasyonuna ve kanser gelişimine yol açabilirler⁴⁶.

a. Helicobacter pylori: Son yıllarda yapılan çalışmalar kronik *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun artmış DNA hasarı, azalan DNA onarım mekanizmaları ve nükleer ve mitokondriyel genomun mutasyonunun indüklenmesi sonucunda gastrik adenokarsinomaya yol açtığını göstermektedir⁴⁷. *Helicobacter pylori* monosit, makrofaj ve nötrofillerin aktivasyonunu dolayısıyla ROS üretimini indükler. Artan ROS üretimine paralel olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonu da artar. iNOS, NO oluşumunu katalize eder ve azot oksit ve peroksinitrit gibi çeşitli reaktif azot türleri oluşur. ROS ve RNS'nin artışı ile baz değişimleri (G:C ve T:A transversiyonları) ve SSB meydana gelir⁴⁸. Takiben, DSB indüksiyonu görülür. Gastrik adenokarsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun başlangıcında DSB birikimi gözlenmemiştir. Bunun nedeni DNA onarım mekanizmalarının sürekli çalışarak DSB'yi onarmasıdır. Ancak, hücreler 48 saat ve daha fazla saat enfeksiyona maruz kaldığında onarım mekanizması bozulmuş ve DSB artışı görülmüştür⁴⁸. *Helicobacter pylori*'nin DSB'ye de neden olduğu, lipit peroksidasyonu indüklediği ve GSH tüketimine neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, DSB onarım mekanizmalarını da etkileyebileceği belirtilmiştir. Tüm bu olaylar ile glandular atrofi, kronik enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, glandular epitel hücrelerde metaplazi ve gastrik kanser oluşum süreci başlar^{48,49}.

b. Gram negatif bakterilerle oluşan DNA çift sarmal kırıkları: Gram negatif bakterilerle yapılan pek çalışma sonucunda bu bakterilerin özellikle ekzotoksinleri ve aynı zamanda neden oldukları oksidatif stres sonucunda oluşan ROS ve RNS ile DSBye ve H2Ax histonunun fosforilasyonuna neden oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmalar aşağıda belirtilmiştir.

- i. *Pseudomonas aeruginosa:* Gram negatif fırsatçı bir bakteridir. Özellikle kistik fibrozisli ya da immün yetmezliği olan hastalarda tahrip edici nazokomial enfeksiyonlara yol açmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte fare akciğer epitel hücrelerinde 8-oxoguanin DNA glikozilaz (OGG1) proteininin sentezinin arttığı gözlenmiştir. Bu protein 8-okzodG tamirinde rol aldığı için bu durumda bakterinin SSBye neden olduğu söylenebilir^{50,51}. Diğer taraftan, bakterinin toksinlerinin DSBye neden olduğunu belirten birçok yeni çalışmalar mevcuttur⁵².
- ii. *Haemophilus ducreyi:* Gram negatif bir bakteri olup, cinsel yolla bulaşan şankroid etkenidir. Bu bakterinin HeLa hücreleri için letal etki gösteren CDT toksinini ürettiği düşünülmektedir. Li ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada bakterinin HeLa hücrelerinde DSB oluşumunu indükledikleri gösterilmiştir⁵³. Diğer taraftan, Frisan ve ark. (2003) HeLa hücrelerinde bakterinin oluşturduğu, CdtA, CdtB ve CdtC toksinlerinin tek başlarına DNA kırıklarını indüklemedikleri ama bu üç toksinin bir kombinasyonunun uygulanması halinde zamanla artan oranda DSB'na yaptıklarını göstermişlerdir⁵⁴.
- iii. *Chlamydia trachomatis:* Gram negatif bir bakteridir ve seksüel temasla bulaşır. Bakteri servikal ve ovaryum kanserlerinin oluşumuna yol açan seksüel hastalıklara neden olur. Chumduri ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada bakterinin Ctr toksininin γ H2AX indüksiyonuna ve DSB oluşumuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca enfeksiyonun, DNA hasar sinyali iletim yollarını bozduğu ve hasarlı konak hücrelerinde apoptoz oluşumunu engellendiği de gösterilmiştir⁵⁵.

c. Hepatit B enfeksiyonu: Kronik dönemde siroz ve hepatosellüler karsinomaya yol açan viral bir enfeksiyondur. Son yıllarda yapılan çalışmalar kronik Hepatit B enfeksiyonunun da DSB ye yol açabileceğini düşündürmektedir⁵⁶. Hsieh ve ark. (2015) 70 kronik hepatit B hastası ile yaptığı bir çalışmada kronik enfeksiyon kaynaklı aşırı ROS üretimi sonucunda meydana gelen oksidatif stresin hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda ve enflamatuvar sitokinlerde artışa; takiben oluşan SSB ve DSB oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizmanın hepatosellüler karsinoma gelişiminde etkili olabileceği önerilmiştir⁵⁷.

Sonuç

Onarılmadığında hücrelerde genomik instabiliteye ve hücre ölümüne yol açtığı için DNA hasarları içinde en tehlikelisi DSBdir ve kanser dahil, pek çok patolojik duruma yol açmaktadır. Pekçok endojen ve eksojen etken sonucu doğrudan veya dolaylı olarak DSB oluşabilmektedir. Yapılan az sayıda çalışma iyonize radyasyon, ROS ve *Helicobacter pylori*'nin SSB, DSB, baz modifikasyonları, pirimidin dimeri oluşumu, DNA üzerinde çapraz bağlanmalar gibi pek çok farklı tip DNA hasarına neden olduğunu belirtmektedir. İyonize radyasyonun melanomalara, *Helicobacter pylori*'nin ise mide/duodenum kanserlerine yol açtığı yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Diğer taraftan, DSB onarım mekanizmalarında ortaya çıkan bozuklukların da birçok hastalığı tetiklediği ve birçok ajana karşı hücrenin verdiği cevabı etkilediği de belirtilmektedir (Tablo 2).⁵⁸ Gelecekte DNAda oksidatif hasar ve diğer etkenlerden kaynaklanan DSBleri ve bunların onarım mekanizmaları üzerine ilgili yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar özellikle DSB oluşumu nedeniyle ortaya çıkan kanserlerin önlenmesi ve tedavisine ışık tutacaktır.

TABLO 2

DNA çift zincir kırığı onarım mekanizmalarında ortaya çıkan bozukluklar ve sonuçları⁵¹

DSB Onarım Mekanizmaları	Gen Mutasyonu Sonucu Ortaya Çıkabilecek Hastalıklar	Normal Gen Ekspresyonunda Değişim Sonucu Ortaya Çıkabilecek Hastalıklar Örnekleri	Tedavi Ajanlarına Yanıt Olarak Yolun Kaybı
HR	Erken başlayan meme/over kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, melanoma ve gastrik kanserde BRCA1/2 mutasyonu, Nijmegen Kırılma Sendromu	Akciğer, over ve akciğer kanserinde BRCA1/2 ekspresyon kaybı; prostat kanserinde NBS1 ekspresyonu kaybı	DSB'na duyarlılık (örneğin, etoposid, bleomisin, iyonize edici radyasyona maruziyet sonucu); DNA çapraz bağlanmalarına duyarlılık (örneğin mitomisin C ile)
NHEJ	Lösemi (DNA ligaz IV mutasyonu), lenfoma (Artemis gen mutasyonu)	Serviks, rektum ve kolon kanserinde Ku70 ekspresyonu kaybı; rektum kanserinde Ku86 ekspresyonu kaybı	DSB'na duyarlılık (örneğin, iyonize edici radyasyon, bleomisin, etoposide maruziyet sonucu)

DSB: DNA çift zincir kırığı; **HR:** homolog rekombinasyon; **NHEJ:** Homolog olmayan uç bağlama

Özet

Endojen ve ekzojen birçok etkene bağlı olarak DNA'da farklı hasarlar oluşabilir. DNA hasarlarının en tehlikelisi ise DNA çift sarmal kırıkları (double strand breaks, DSB)'dir. DSB onarımı normalde iki farklı yolla gerçekleştirilir. Ancak, bu onarım yollarında meydana gelen herhangi bir bozukluk kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalığa yol açabilir. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların indüklediği reaktif oksijen türleri (ROS) DSB'na neden olan başlıca etkenlerdir. İyonize radyasyon da dolaylı yolla canlı dokuda yoğun olarak bulunan su molekülüyle etkileşerek oksidatif strese, ROS ve ardından DSB oluşumuna neden olmaktadır. Çevresel veya tedavi amaçlı maruz kalınan pek çok kimyasal ajan ya da ilacın (antikanser ajanlar, ağır metaller, asbest, ftalatlar, benzen, okratoksin A gibi) da DSB'ye neden olduğu yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Diğer taraftan, insanda gastrit ve ülserle neden olan bir bakteri olan *Helicobacter pylori*'nin de DSB oluşumu üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca pek çok bakteri toksinin de DSB'ye neden olabileceği bildirilmiştir. Bu derleme kapsamında DSB'e neden olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar ve etki mekanizmaları tartışılacaktır.

Anahtar kelimeler: DNA çift sarmal kırıkları, iyonize edici radyasyon, *Helicobacter pylori*, oksidatif stres

Abstract

Physical, chemical and biological agents that cause DNA double strand breaks

Endogenous and exogenous factors can cause different types of DNA damages. The most dangerous DNA damage is double strand break (DSB). Under normal conditions, DSB repair is substantiated by two different mechanisms. However, any disruption in these repair pathways can cause cancer, aging and different types of genetic disorders. Reactive oxygen species (ROS) induced by physical, chemical and biological agents are the main causes that lead to the formation of DSBs. In living tissues, ionized radiation can interact with water molecules and can cause oxidative stress and formation of ROS and DSB, respectively. Several chemical agents or drugs that humans are exposed to, by environment or therapy (anticancer drugs, heavy metals, asbestos, phthalates, benzene, ochratoxin A), were shown to cause DSB by several studies. Research on DSB causing effects of *Helicobacter pylori*, a bacterium that causes gastritis and ulcer in humans, is still in progress. In addition, several bacterial toxins were stated to cause DSB. This review will mainly focus on agents that cause DSB and their mechanisms of action.

Keywords: DNA double strand breaks, ionized radiation, *Helicobacter pylori*, oxidative stress

KAYNAKLAR

1. Hoeijmakers, J.H.: DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* ,361,1475 (2009)
2. Keith, A.R., Bailey, J.K, Whitham, T.G.: A genetic basis to community repeatability and stability. *Ecology*, 91, 3398 (2010)
3. Esteller, M.: Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet*, 16 ,50 (2007)
4. Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709 (1993)
5. Sander, M., Cadet, J., Casciano, D.A., Galloway, S.M., Marnett, L.J., Novak, R.F., Pettit, S.D., Preston, R.J., Skare, J.A., Williams, G.M., Van Houten, B., Gollapudi, B.B.: Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC. *Toxicol Appl Pharmacol*. 208, 1 (2005)
6. Lemaitre, C., Soutoglou, E.: Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair. *DNA Repair*, 19,163 (2014)
7. Bush, S.P., Hart, P.E., Russell, E.M.: Investigating DNA Damage. *The American Biology Teacher*, 68,280 (2006)
8. Elia, M.C., DeLuca, J.G., Bradley, M.O.: Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells. *Pharmacol Ther*, 51,291 (1991)
9. Vamvakas, S., Vock, E.H., Lutz, W.K.: On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol*, 27,155 (1997)
10. Aguilera, A., Gaillard, H. :Transcription and recombination: when RNA meets DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* , 6, doi:10.1101/cshperspect.a01654
11. Hamperl, S., Cimprich, K.A.: The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA Repair*, 19,84 (2014)
12. McCabe, E.R. :Role of mitochondria in oncogenesis. *Biochem Med Metab Biol*, 47,105(1992)
13. Sczepanski, J.T., Jacobs, A.C., Van Houten, B, Greenberg, M.M.: Double-strand break formation during nucleotide excision repair of a DNA interstrand cross-link. *Biochemistry*, 48, 7565 (2009)
14. Kozmin, S.G., Sedletska, Y., Reynaud-Angelin, A., Gasparutto, D., Sage, E.: The formation of double-strand breaks at multiply damaged sites is driven by the kinetics of excision/incision at base damage in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res*, 37, 1767 (2009)
15. Barnard, S., Bouffler, S., Rothkamm, K.: The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair. *Genome Integr* ,4, 1 (2013)
16. Cadet, J., Ravanat, J.L., TavernaPorro, M., Menoni, H., Angelov, D.: Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett*, 327, 5 (2012)
17. Yamaguchi, H., Uchihori, Y., Yasuda, N., Takada, M., Kitamura, H.: Estimation of yields of OH radicals in water irradiated by ionizing radiation. *J Radiat Res*, 46, 333 (2005)
18. Cannan, W.J, Pederson, D.S.: Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, doi:10.1002/jcp.25048 (2015)
19. Povirk, L.F.: DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* ,355,71 (1996)

20. Anderson, R.D., Berger, N.A.: International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat Res*, 309,109 (1994)
21. Patel, E., Reynolds, M.: Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicol Lett*, 222,265 (2013)
22. Ondovcik, S.L., Tamblyn, L., McPherson, J.P., Wells, P.G.: Oxoguanine glycosylase 1(OGG1) protects cells from DNA double-strand break damage following methylmercury (MeHg) exposure. *Toxicol Sci*, 128,272 (2012)
23. Kryeziu, K., Jungwirth, U., Hoda, M.A., Ferk, F., Knasmüller, S., Karnthaler-Benbakka, C., Kowol, C.R., Berger, W., Heffeter, P.: Synergistic anticancer activity of arsenic trioxide with erlotinib is based on inhibition of EGFR-mediated DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther*, 12, 1073 (2013)
24. Xie, H., Huang, S., Martin, S., Wise, J.P. Sr.: Arsenic is cytotoxic and genotoxic to primary human lung cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 760,33(2014)
25. Jiang, L., Nagai, H., Ohara, H., Hara, S., Tachibana M., Hirano S., Shinohara Y., Kohyama N., Akatsuka S., Toyokuni S.: Characteristics and modifying factors of asbestos-induced oxidative DNA damage. *Cancer Sci*, 99, 2142 (2008)
26. Msiska, Z., Pacurari, M., Mishra, A., Leonard, S.S., Castranova, V., Vallyathan, V.: DNA double-strand breaks by asbestos, silica, and titanium dioxide: possible biomarker of carcinogenic potential? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43, 210 (2010)
27. Okayasu, R., Takahashi S., Yamada S., Hei T.K., Ullrich R.L.: Asbestos and DNA double strand breaks. *Cancer Res*, 59, 298 (1999)
28. Marczynski, B., Czuppon, A.B., Marek, W., Reichel, G., Baur, X.: Increased incidence of DNA double-strand breaks and anti-ds DNA antibodies in blood of workers occupationally exposed to asbestos. *Hum Exp Toxicol*, 13, 3 (1994)
29. Lau, A., Belanger, C.L., Winn, L.M.: In utero and acute exposure to benzene: investigation of DNA double-strand breaks and DNA recombination in mice. *Mutat Res*, 676, 74 (2009)
30. Hartwig A.: The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis. *Chem Biol Interact*, 184,269 (2010)
31. Albro P.W., Lavenhar S.R.: Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev*,21,13 (1989)
32. Erkekoglu, P., Kocer-Gumusel, B.: Genotoxicity of phthalates. *Toxicol Mech Methods*, 24,(2014)
33. Erkekoglu, P., Zeybek, N.D., Giray, B.K., Rachidi, W., Kızılgün, M., Hininger-Favier, I., Favier, A., Asan, E., Hincal, F.: The effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int J Exp Pathol*, 95, 64 (2014)
34. Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Boureiko, A., Melnyk, S., Bagnyukova, T.V., Montgomery, B., Rusyn, I.: Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res*. 644, 17 (2008)
35. Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O.G., Giray, B., Favier, A., Ozturk, M., Hincal, F.: Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 248, 52 (2010)

36. Erkekoğlu, P., Rachidi, W., De Rosa, V., Giray, B., Favier, A., Hincal, F.: Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radic Biol Med*, 49, 559 (2010)
37. Caldwell, J.C.: DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms-a review. *Mutat Res*, 751, 82 (2012)
38. Wang X., Jiang L., Ge L., Chen M., Yang G., Ji F., Zhong L., Guan Y., Liu X.: Oxidative DNA damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in HEK-293 cell line. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39,1099 (2015)
39. Slator, C., Barron, N., Howe, O., Kellett ,A. [Cu(o-phthalate)(phenanthroline)] exhibits unique superoxide-mediated NCI-60 chemotherapeutic action through genomic DNA damage and mitochondrial dysfunction. *ACS Chem Biol*, Oct (2015).
40. Visagie, C.M, Varga J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K.A., Frisvad, J.C., Samson, R.A.: Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol*, 78,1 (2014)
41. Palabiyik, S.S., Erkekoglu, P., Zeybek, N.D., Kizilgun, M., Baydar, D.E., Sahin, G., Giray, B.K.: Protective effect of lycopene against ochratoxin A induced renal oxidative stress and apoptosis in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 65, 853 (2013)
42. Ochratoxin A. (Group 2B). International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations. 5. Summary of Data Reported and Evaluation. Internet Adresi: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/13-ochra.html>. Erişim Tarihi: 30.7.2015.
43. Aydin, S., Palabiyik, S.S., Erkekoglu, P., Sahin, G., Başaran, N., Giray, B.K.: The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. *Toxicol*. 73, 96 (2013)
44. Kuroda, K., Hibi, D., Ishii, Y., Takasu, S., Kijima, A., Matsushita, K., Masumura, K., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Sakai, H., Yanai, T., Nohmi, T., Ogawa, K., Umemura, T.: Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of gpt delta rats. *Mutagenesis*, 29, 27 (2014)
45. Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., Bonner, W.M.: Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res* 704, 152 (2010)
46. Machado, A.M., Figueiredo, C., Seruca, R., Rasmussen, L.J. :*Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta* , 1806, 58 (2010)
47. Hanada, K., Uchida, T., Tsukamoto, Y., Watada, M., Yamaguchi, N., Yamamoto, K., Shiota, S., Moriyama, M., Graham, D.Y., Yamaoka, Y.: *Helicobacter pylori* infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. *Infect Immun*, 82, 4182 (2014)
48. Toller, I.M., Neelsen, K.J., Steger, M, Hartung, M.L., Hottiger, M.O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A.A., Lopes, M., Müller, A.: Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108,14944 (2011)
49. Han, Y.M., Park, J.M., Jeong, M., Yoo, J.H., Kim, W.H., Shin, S.P., Ko, W.J., Hahm, K.B. Dietary, non-microbial intervention to prevent *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *Ann Transl Med*, 3, 122 (2015)
50. Elsen S., Collin-Faure V., Gidrol X., Lemerrier C.: The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* activates the DNA double-strand break signaling and repair pathway in infected cells. *Cell Mol Life Sci*, 70,4385 (2013)

51. Lemercier C.: When our genome is targeted by pathogenic bacteria. *Cell Mol Life Sci*,72,2665 (2015)
52. Lai, C.H., Chang, C.S., Liu, H.H., Tsai, Y.S., Hsu, F.M., Yu, Y.L., Lai, C.K., Gandee, L., Pong, R.C., Hsu, H.W., Yu, L., Saha, D., Hsieh, J.T. Sensitization of radio-resistant prostate cancer cells with a unique cytolethal distending toxin. *Oncotarget*, 5, 5523 (2014)
53. Li, L., Sharipo, A., Chaves-Olarte, E., Masucci, M.G., Levitsky, V., Theleslalm, M., Frisan, T.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell. Microbiol.*: 4,87(2002)
54. Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerl w, B., Thelestam, M.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol*, 10,695(2003)
55. Chumduri, C., Gurumurthy, R.K., Zadora, P.K., Mi, Y., Meyer, T.F.: Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. *Cell Host Microbe*, 13,746 (2013)
56. Hsieh Y.H., Chang Y.Y., Su I.J., Yen C.J., Liu Y.R., Liu R.J, Hsieh W.C., Tsai H.W., Wang L.H., Huang W. : Hepatitis B virus pre-S2 mutant large surface protein inhibits DNA double-strand break repair and leads to genome instability in hepatocarcinogenesis. *J Pathol*, 236,337 (2015)
57. Wang X., Jiang L., Ge L., Chen M., Yang G., Ji F., Zhong L., Guan Y., Liu X.: Oxidative DNA damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in HEK-293 cell line. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39,1099 (2015)
58. Kennedy, R.D., D'Andrea A.D. DNA Repair Pathways in Clinical Practice: Lessons From Pediatric Cancer Susceptibility Syndromes. *J Clin Oncol*, 24, 3799 (2006)