

Produkty naprawy DNA: 8-oksyo-7,8-dihydroguanina (8-oksyoGua) i 8-oksyo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna (8-oksyoG) wycięte z DNA w procesie komórkowej naprawy, są wydalane do moczu w postaci niezmiennych. Uznana metoda oznaczania uszkodzeń DNA w moczu jest wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC z następną chromatografią gazową z detektorem spektrometrii masowej (GC/MS). Udowodniono, że promieniowanie jonizujące jest źródłem wolnych rodników tlenowych zarówno w miejscu leczenia, jak i na poziomie całego organizmu, powodując indukację oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Analiza poziomów 8-oksyoGua i 8-oksyoG w moczu pacjentów pobranym przed radioterapią i w różnym czasie po napromienianiu powinna dostarczyć danych informujących o efektywności naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Porównanie wartości poziomu tych modyfikacji z parametrami oceniającymi powodzenie terapii, takimi jak długość przeżycia całkowitego czy czas do progresji choroby, powinno pozwolić na określenie, czy istnieje związek przyczynowo-skutkowy między efektywnością reperacji uszkodzeń indukowanych promieniowaniem jonizującym w DNA a rokowaniem pacjenta.

Słowa kluczowe: oksydacyjne uszkodzenia DNA, radioterapia, 8-oksyoGua, 8-oksyoG.

Oksydacyjne uszkodzenia DNA jako potencjalne markery skuteczności radioterapii

Oxidative DNA damage as a potential marker for radiotherapy

Krzysztof Roszkowski, Piotr Błaszczuk

Oddział Radioterapii, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Wstęp

Każda komórka aerobowa wytwarza w przebiegu metabolizmu pewne ilości reaktywnych form tlenu (RFT) [1], które indukują szereg uszkodzeń zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA. Uszkodzenia oksydacyjne DNA odgrywają znaczącą rolę w patogenezie niektórych chorób człowieka, m.in. chorób nowotworowych, chorób układu krążenia oraz zmian związanych ze starzeniem się organizmów [2, 3]. W warunkach fizjologicznych za uszkodzenia materiału genetycznego jest odpowiedzialny głównie rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) [4], uszkadzający przede wszystkim zasady azotowe, czego konsekwencją jest powstanie szeregu pochodnych. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 20 różnego rodzaju oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych [5]. Poziom form wolnorodnikowych w organizmie jest zmienny w czasie, dlatego organizmy tlenowe w trakcie ewolucji wykształciły cały szereg mechanizmów adaptacyjnych do takich zmiennych warunków, indukując syntezę enzymów antyoksydacyjnych i/lub enzymów naprawiających oksydacyjne uszkodzenia DNA [6–8].

Wpływ promieniowania jonizującego na DNA

Oddziaływanie promieniowania jonizującego stosowanego w radioterapii nowotworów z cząsteczką wody (tzw. radioliza wody) jest odpowiedzialne za powstawanie wolnych rodników tlenowych – RFT – (głównie rodnika hydroksylowego), które ze względu na wysoką reaktywność oddziałują z biomolekułami, tworząc większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA [9, 10]. Dlatego jest możliwe, że oksydacyjne uszkodzenia DNA, które powstają w wyniku radioterapii, są w znaczącej części odpowiedzialne za efekty terapeutyczne i mogą mieć wpływ na powstanie efektów ubocznych. Metody pomiaru tych uszkodzeń mogą być wykorzystane, by zoptymalizować warunki naświetlania i zmniejszyć ryzyko wtórnych nowotworów, których powstanie jest związane z radioterapią [11]. Jest szeroko akceptowane, że uszkodzenia DNA, takie jak oksydacyjnie zmodyfikowane zasady i nukleotydy 8-oksyo-7,8-dihydroguanina (8-oksyoGua) i 8-oksyo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna (8-oksyoG) wycięte z DNA w procesie komórkowej naprawy, są wydalane do moczu bez dalszego metabolizmu w postaci niezmiennych.

Jednym z czynników decydujących o powodzeniu radioterapii jest naprawa uszkodzeń DNA zarówno w komórkach guza, jak i w komórkach prawidłowych. Właściwością komórek nowotworowych nabytą w trakcie transformacji, która może decydować o odporności na radioterapię lub niektóre chemioterapeutyki, jest zwiększona aktywność enzymów naprawiających uszkodzone DNA. W wielu badaniach udowodniono, że zwiększenie ekspresji genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w naprawie DNA

The products of cellular repair 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) are excreted in urine. Reliable assays have been developed to measure urinary DNA lesions, such as HPLC purification followed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). It is well known that ionizing radiation is a source of oxygen-derived species such as free radicals. Analysis of levels of 8-oxoGua and 8-oxodG in urine taken from patients before radiotherapy and at various times after irradiation should provide information about the efficiency of repair of oxidative DNA damage. Comparison of value level of these modifications with parameters estimating the success of therapy, such as the length of total survival or time to progression of disease, allows one to determine whether a cause-effect relationship exists between the efficiency of repair of radiotherapy-induced DNA damage and patient prognosis.

Key words: oxidative DNA damage, radiotherapy, 8-oxoGua, 8-oxodG.

w napromienianym guzie nowotworowym, jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [12–14]. Na poziomie komórki nowotworowej wydajne systemy naprawy DNA będą więc przeszkodą w uzyskaniu wyleczenia.

Mechanizmy naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA

Wyniki wielu prac eksperymentalnych wskazują jednoznacznie, że stężenie 8-oksydG w moczu jest bardzo czułym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego – przyjmuje się, że może być ono odzwierciedleniem aktywności enzymów biorących udział w naprawie typu NER (naprawa na drodze wycinania nukleotydów) lub białka hMTH hydrolizującego 8-oksydGTP [15, 16]. Jednak głównym mechanizmem naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA są mechanizmy naprawy typu BER (naprawa na drodze wycinania zasad azotowych). Potwierdzono to odkryciem i sklonowaniem specyficznych glikozylaz rozpoznających i usuwających z DNA oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe [17]. System naprawy typu NER w przypadku oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych ma znaczenie wspierające [18]. Należy zatem spodziewać się, że analiza zawartości 8-oksyguaniny w moczu (zmodyfikowanej zasady), która jest produktem działania glikozylaz, pozwoli na pełniejszą ocenę procesów naprawy DNA [19]. Tymczasem, z nielicznymi wyjątkami, prawie wszystkie prace dotyczące tej tematyki poświęcone były detekcji 8-oksydG [20]. Wynikało to przede wszystkim z problemów metodycznych; analiza prób jest niezwykle skomplikowana. Problemy te zostały pokonane przez zespół prof. Olińskiego z Katedry Biochemii Klinicznej *Collegium Medicum UMK* w Bydgoszczy. Zaadaptowano technikę, która pozwala na jednoczesną analizę zarówno zmodyfikowanej zasady, jak i nukleozydu w jednej próbce moczu. Polega ona na wstępnym oczyszczeniu frakcji zawierających zmodyfikowane związki metodą HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) i ich późniejszej analizie techniką GC/MS (chromatografia gazowa ze spektrometrią masową). Do precyzyjnej jakościowej i ilościowej oceny zastosowano analogi badanych molekuł znakowane stabilnymi izotopami [2].

Kliniczne znaczenie analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA

W dużych stopniach zaawansowania choroby (III i IV stopień) leczenie przeciwnowotworowe opiera się zasadniczo na radioterapii i/lub chemioterapii. Jednym ze wspólnych czynników występujących przy takim leczeniu jest tzw. stres oksydacyjny na poziomie komórek nowotworowych i całego organizmu.

W pracy Roszkowskiego i wsp. [21] po raz pierwszy wykazano obecność biomarkerów uszkodzeń oksydacyjnych DNA wywołanych promieniowaniem u chorych na raka regionu głowy i szyi: wydzielane w moczu 8-oksydG, 8-oksy-7, 8-oksyGua, jak również stężenia 8-oksyGua w DNA leukocytów krwi obwodowej (wszystkie te parametry obrazują oksydacyjne uszkodzenia DNA na poziomie całego organizmu). Wykazano wzrost wydzielania 8-oksydG w moczu, wywołany promieniowaniem. Wyniki te były zbieżne z pracą Haghdoost i wsp. [22], którzy dostrzegli zwiększenie tej modyfikacji u pacjentek z rakiem piersi po radioterapii uzupełniającej zabieg operacyjny. Jednakże pomiar wyłącznie moczowego wydzielania produktu naprawy 8-oksydG może czasami wprowadzać w błąd, ponieważ nie daje żadnej informacji o oksydacyjnym stanie organizmu (tempo uszkodzeń vs tempo naprawy) w komórkowym DNA i donosi tylko o wartości średniej naprawy uszkodzeń występujących w przeszłości. Dlatego też w cytowanym badaniu [21] pierwszy raz analizowano szeroki zakres parametrów, które opisują oksydacyjne uszkodzenia DNA. W przeciwieństwie do moczowego 8-oksydG, nie zanotowano wywołanego promieniowaniem wzrostu moczowego poziomu zmodyfikowanej zasady.

Moczowe wydzielanie 8-oksydG i 8-oksyGua jest miarą aktywności enzymów, które są włączone w usuwanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA [23]. Pewna liczba danych literaturowych wskazuje, że ścieżka naprawy przez wycinanie zasad, mianowicie glikozylaza *hOGG1*, która usuwa 8-oksyGua z komórkowego DNA, jest odpowiedzialna za jej obecność w moczu [23–25]. Interesujące jest doniesienie, w którym u pacjentów z rakiem głowy i szyi zna-

cząco zmniejszyła się działalność naprawy 8-oksyoGua powstałej w DNA [26]. Autorzy tej pracy zasugerowali, że zmniejszona działalność głównego enzymu odpowiedzialnego za usunięcie 8-oksyoGua z DNA powinna skutkować akumulacją uszkodzeń w komórkowym DNA. Dlatego jest możliwe, że co najmniej w przypadku niektórych pacjentów z najmniejszą aktywnością *hOGG1* połączenie zredukowanej aktywności *hOGG1* i radioterapii ma związek ze zwiększonym stężeniem 8-oksyoGua pochodzącej z komórkowego DNA. Widocznie zmniejszona naprawa DNA jest niezdolna do tego, by poradzić sobie z wywołaną promieniowaniem dodatkową ilością 8-oksyoGua prowadzącej do wzrostu uszkodzeń potencjalnie mutagenicznych w komórkach.

Zmienna wrażliwość osobnicza na promieniowanie jonizujące i wynikająca z tego faktu zmienna odpowiedź są głównymi problemami w radioterapii i nie mogą wiarygodnie zostać przewidziane przed terapią. Dlatego istnieje możliwość, że ta zmienność może częściowo wyjaśnić różnice w klinicznej odpowiedzi na terapię [27, 28].

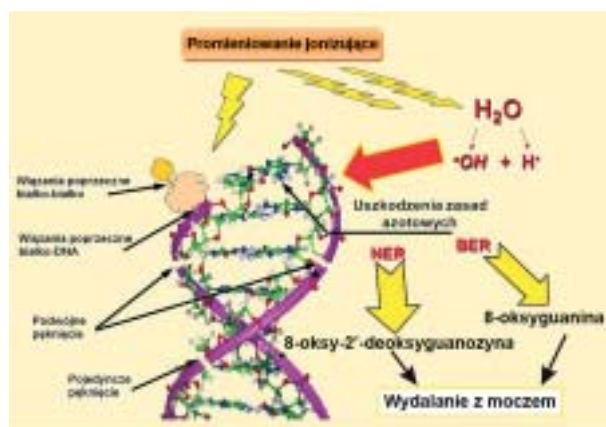
W każdej komórce obecna jest pewna ilość oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych. Jest to wyraz równowagi istniejącej między powstawaniem RFT atakujących DNA w przebiegu wielu procesów metabolicznych i usuwaniem uszkodzeń tych biomolekuł przez swoiste enzymy reperujące DNA. Europejski Komitet Standardów Uszkodzeń Oksydacyjnych DNA (*European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*) ustanowił rzeczywiste poziomy 8-oksyoG w zakresie od 0,2 do kilku modyfikacji/10⁶ par zasad dla komórek prawidłowych [29].

Analizując zawartości oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu, można ocenić skalę naprawy na poziomie całego organizmu. Wysokie poziomy wydalanych z moczem oksydacyjnych uszkodzeń DNA są wskaźnikiem nasilonego poziomu stresu oksydacyjnego, ale mogą również odzwierciedlać wysoką sprawność systemów naprawy tychże uszkodzeń (stres oksydacyjny może być duży, a mechanizmy naprawy usuwają jego skutki). Połączenie danych o poziomie podstawowym właściwym dla każdego pacjenta z analizą wydalanych w moczu 8-oksyoGua i 8-oksyoG, może natomiast wyraźnie obrazować informacje o mechanizmach naprawy DNA.

Analiza stężeń 8-oksyoGua i 8-oksyoG w moczu pacjentów pobranym przed radioterapią i w różnym czasie po napromieniowaniu powinna dostarczyć danych informujących z jednej strony o efektywności naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA, z drugiej – o natężeniu stresu oksydacyjnego na poziomie całego organizmu.

Porównanie wartości poziomu tych modyfikacji z parametrami oceniającymi powodzenie terapii, takimi jak długość przeżycia całkowitego, czy czas do progresji choroby, powinno pozwolić na określenie, czy istnieje związek przyczynowo-skutkowy między efektywnością reparaacji uszkodzeń indukowanych promieniowaniem jonizującym w DNA a rokowaniem pacjenta.

Stwierdzenie takiej korelacji mogłoby być jednym z parametrów decydujących o ewentualnym ponownym zastosowaniu radioterapii lub odstąpieniu od napromieniania w przypadkach wątpliwych klinicznie.



Promieniowanie jonizujące oddziałuje bezpośrednio z cząsteczką DNA lub poprzez radiolizę cząsteczek wody obecnych w komórce. Reakcja z cząsteczką deoksyrybozy prowadzi do powstania pojedynczych, podwójnych pęknięć nici DNA, tworzenia wiązań poprzecznych DNA-białko. Rodnik hydroksylowy jest uważany za główną, aktywną formę tlenu odpowiedzialną za powstawanie większości oksydacyjnych uszkodzeń w DNA, które naprawiane są w procesach BER i NER. Produkty działania tych ścieżek naprawy to np. 8-oksyoGua i 8-oksyoG, które w postaci niezmięnionej są wydalane z moczem.

Ryc. 1. Wpływ promieniowania jonizującego (IR) na DNA komórki
Fig. 1. The effect of ionizing radiation (IR) upon cellular DNA

Piśmiennictwo

- Oliński R, Jurgowiak M. Reaktywne formy tlenu – uniwersalny czynnik patogenny? W: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T (red.). Sorus, Poznań 1996; 373-400.
- Rozalski R, Gackowski D, Roszkowski K, Foksiński M, Oliński R. The level of 8-hydroxyguanine, a possible repair product of oxidative DNA damage, is higher in urine of cancer patients than in control subjects. *Cancer Epid Biom Prev* 2002; 11: 1072-5.
- Roszkowski K. Biomarkery reparaacji DNA w moczu. *Współcz Onkol* 2002; 5: 272-6.
- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1: 358-4.
- Dizdareglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993; 315: 1-6.
- Demple B, Herman T, Chcn DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11450-4.
- Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, Tano K, Mitra S. Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8901-4.
- Nash M, Bruner SD, Scharer GD, Kawate T, Addona TA, Spooner B, Lane WS, Verdine GL. Cloning of a yeast 8-oxo-guanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 1996; 6: 968-80.
- Roszkowski K, Foksiński M. Wpływ promieniowania jonizującego na DNA komórki. *Współcz Onkol* 2005; 9: 284-6.
- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1: 358-4.
- Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 943-55.
- Santucci MA, Barbieri E, Frezza G, et al. Radiation-induced GADD45 expression correlates with clinical response to radiotherapy of cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 411-6.

13. Ahmed MM. Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 43-52.
14. Synowiec E, Stefanska J, Morawiec Z, Blasiak J, Wozniak K. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mutat Res* 2008; 648: 65-72.
15. Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. Urinary 8-okso-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radic Res* 2000; 32: 381-97.
16. Roszkowski K. Mechanizmy naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. *Współcz Onkol* 2002; 6: 360-5.
17. Boiteux S, Radicella JP. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 1999; 81: 59-67.
18. Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr VA. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J Biol Chem* 1998; 273: 33811-6.
19. Gackowski D, Rozalski R, Roszkowski K, Jawien A, Foksinski M, Olinski R. 8-Okso-7,8-dihydroguanine and 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet. *Free Radic Res* 2001; 35: 825-32.
20. Cooke MS, Olinski R, Loft S. Measurement and Meaning of Oxidatively Modified DNA Lesions in Urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3-14.
21. Roszkowski K, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Siomek A, Guz J, Szpila A, Foksinski M, Olinski R. Small field radiotherapy of head and neck cancer patients is responsible for oxidatively damaged DNA/oxidative stress on the level of a whole organism. *Int J Cancer* 2008; 123: 1964-7.
22. Haghdoost S, Svoboda P, Naslund I, Harms-Ringdahl M, Tilikides A, Skog S. Can 8-okso-dG be used as a predictor for individual radiosensitivity? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 405-10.
23. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, Lunec J and Olinski R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res* 2005; 574: 58-66.
24. Olinski R, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Siomek A, Cooke MS. Urinary measurement of 8-OksodG, 8-OksoGua, and 5HMUra: a noninvasive assessment of oxidative damage to DNA. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1011-9.
25. Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 1071-6.
26. Paz-Elizur T, Ben-Yosef R, Elinger D, et al. Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and Neck cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 11683-9.
27. Gentil A, Le PF, Cadet J, Sarasin A. Mutation spectra induced by replication of two vicinal oxidative DNA lesions in mammalian cells. *Mutat Res* 2000; 452: 51-6.
28. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007; 447: 941-50.
29. Gedik CM, Collins A; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 2005; 19: 82-4.

Adres do korespondencji

dr med. **Krzysztof Roszkowski**
Oddział Radioterapii
Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka
ul. I. Romanowskiej 2
85-796 Bydgoszcz
e-mail: roszkowskik@co.bydgoszcz.pl