

6. Williams-Russo P, Sharrock NE, Mattis S, Szatrowski TP, Charlson ME. Cognitive effects after epidural vs general anesthesia in older adults. *JAMA* 1995; 274: 44-50.
7. Shaw PJ, Bates D, Cartledge NEF, French JM, Heaviside D, Julian DG et al. Long-term intellectual dysfunction following coronary artery bypass graft surgery: a six month follow-up study. *Q J Med* 1987; 239: 259-68.
8. McKhann GM, Goldsborough MA, Borowicz LM, Selnes OA, Mellits ED, Enger C et al. Cognitive outcome after coronary artery bypass: a one-year prospective study. *Ann Thorac Surg* 1997; 63: 510-5.
9. Møller JT, Svønnild I, Johannessen NW, Jensen PF, Espersen K, Gravenstein JS et al. Perioperative monitoring with pulse oximetry and late postoperative cognitive dysfunction. *Br J Anaesth* 1993; 71: 340-7.
10. Møller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly: ISPOCD1 study. *Lancet* 1998; 351: 857-61.
11. Rasmussen LS, Steentoft A, Rasmussen H, Kristensen PA, Møller JT and the ISPOCD group. Benzodiazepines and postoperative cognitive dysfunction in the elderly. *Br J Anaesth* 2000 (i trykken).
12. Mikkelsen H, Rentowl P, Rasmussen LS, Hanning CD, Møller JT. Cognitive dysfunction may persist 1-2 years after major non-cardiac surgery. *Anesthesiology* 1998; 89: A1212.
13. Newman S, Klinger L, Venn G, Smith P, Harrison M, Treasure T. Subjective reports of cognition in relation to assessed cognitive performance following coronary artery bypass surgery. *J Psychosom Res* 1989; 33: 227-33.

## Oxidativ stress og aldring

### STATUSARTIKEL

Søren Astrup Jensen, hum.biol. Bente Riis Jensen,  
cand.scient. Allan Weiman, Liu Li &  
Henrik Enghusen Poulsen

Aldring kan defineres bredt som de blivende forandringer i organismen, der opstår med tiden. Ud over den terapeutiske interesse for de øjensynlige senfølger af års tiltagende vævsforandringer er der en stigende interesse for de aldringsprocesser, der er bestemmende herfor, ud fra en forventning om at de ikke nødvendigvis er uafvendelige, men fundamentalt kan påvirkes i gunstig retning. Vævshenvalg, tab af regenerationssevne og tiltagende ophobning af skader i mangfoldige biokemiske strukturer må nødvendigvis indgå som variable i komplekse teorier for at give en dækkende beskrivelse af aldringsprocessen. Her skal gives en kort fremstilling af fænomenet, for så vidt angår den fysisk-kemiske påvirkning af arvemassen, der antages at have en betragtelig betydning for aldringsprocessen.

#### Oxidativ beskadigelse fra endogene reaktive oxygenradikaler

Frie oxygenradikaler dannes vedvarende ved cellulær metabolisme som mitokondriel respiration og fedtsyreoxidation i peroxisomer og dannes i større mængde af aktiverede makrofager og leukocytter som en cellemedieret forsvarsmekanisme. Herved opstår det paradoks, at den livsnødvendige oxidative fosforylering i mitokondrierne udgør en trussel mod cellens arvemasse. Under den mitokondrielle respiration transporteres elektroner gennem elektrontransportkæden til cytochromeoxidase som oxideres af  $O_2$ . Cirka 95% af den forbrugte ilt i respirationskæden omdannes i en 4-elektrons reduktion til vand, mens op til 5% vil reduceres ved en 1-elektronsreduktion med dannelse af superoxidradikalet  $O_2^{\cdot-}$  til følge. Superoxid omsættes af superoxididismutase til

$H_2O_2$  som en del af det antioxidative forsvar, hvorefter  $H_2O_2$  kan inaktiveres til vand af catalase eller peroxidase. Den del af  $H_2O_2$  der ikke inaktiveres til vand af catalase eller peroxidase kan omdannes til det meget reaktive hydroxylradikal  $OH^{\cdot}$  og sekundære radikaler som for eksempel peroxyradikaler i en proces katalyseret af overgangsmetaller ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) (1).  $OH^{\cdot}$  reagerer med stort set alle typer af cellulære makromolekyler inklusive sukker, proteiner, fosfolipider og nukleotider.

#### DNA-beskadigelse

Den cellulære arvemasse DNA bliver til stadighed ændret kemisk som følge af reaktion med frie radikaler. Selv om frie oxygenradikaler kan modificere en hvilken som helst cellulær struktur eller molekyle har reaktion med DNA formentlig de mest vidtrækkende konsekvenser. DNA-skader som følge af oxygenradikaler har et meget varieret billede, der spænder fra DNA-strengbrud med større kromosomalt rearrangement til mindre kemiske ændringer af deoxyribose eller nukleobaserne. Deoxyribosefosfodiester-skelettet af DNA bliver let angrebet af oxygenradikaler, der fører til fragmentering af ribosen med dannelse af basefrie (AP) sites eller enkeltstrengbrud. Enkeltstrengbrud er sædvanligvis ikke letalt for cellen, fordi de to strenge bliver holdt sammen af den komplementære streng og kan repareres før replikation. Dobbeltstrengbrud kan opstå, hvis større energimængder afsættes lokalt og fører til multipel radikaldannelse over en kort strækning af DNA. De er langt mere toksiske for celler end enkeltstrengbrud og giver sædvanligvis anledning til permanent skadet DNA og celledød.

#### Nukleobaseskader

Frie radikaler som  $OH^{\cdot}$ - og H-radikaler reagerer med komponenter af DNA ved addition eller fraspaltning (2). Den videre reaktion af DNA-radikalerne afhænger af deres redox egenskaber, deres reaktionspartnere og reaktionsbetingelser, og resulterer i dannelsen af en lang række slutprodukter, der alle kan genfindes in vivo i væv.

Nukleobaseskade kan inddeles i hydroxylerede baser,

ringåbnede baser, basefragmenter og dimerdannelse. Næsten 100 mere eller mindre stabile former af fri radikal modificerede nukleobaser er beskrevet, hvoraf de 20 hyppigste udgør omkring 95% af de mængder, der findes in vivo i genom DNA (2).

På grund af sin elektrofile natur reagerer  $\text{OH}^\bullet$  fortrinsvis med C5 (hvor elektrontætheden er størst) og i mindre grad med C6 af thymin og cytosin. Herved dannes de tilsvarende 5-OH-6-yl og 6-OH-5-yl pyrimidinradikaler (2), der ved reaktion med oxygen omsættes til peroxyradikaler. Ved fjernelse af  $\text{O}_2^-$  og  $\text{OH}^-$ -addition omdannes disse til cytosin- og thymin-glycoler (2). Cytosinprodukterne er ustabile og omdannes til uracilderivater (2).  $\text{OH}^\bullet$ - og H-radikaler reagerer med C4, C5 og C8 i purinerne (2). Oxidation af C8 fører til dannelse af 8-oxo-deoxyGuanosin (8-oxodG) og 8-oxo-deoxyAdenosin, mens tilsvarende reduktion fører til imidazolring-åbning og dannelse af formamidopyrimidiner (2).

Toksiciteten af de modificerede baser beror på, at de enten ikke lader sig transskribere eller replicere, eller at de har ændrede baseparrende egenskaber og derfor er potentielt mutagene. Således kan både dC og (fejlagtigt) dA baseparres og indbygges over for den reaktive oxygenradikal modificerede 8-oxodG under replikation (3). Forlængelse af DNA fra dA:8-oxodG-basepar er vist at være effektiv, og fejlparringen genkendes ikke som substrat af exonuclease-proofreading funktionen af DNA-polymerase I (3). dC:8oxodG vil bevare den genetiske information under DNA-syntese, mens dA:8-oxodG baseparring kan føre til G:C - T:A transversion, medmindre den misparrede dA fjernes før yderligere replikation (3).

I mennesket er kinetikken og dynamikken af 8-oxodG bedre undersøgt end de øvrige basemodifikationer, hvilket dels beror på, at denne forbindelse frembyder måletekniske fordele, dels på, at 8-oxodG anses af større betydning vurderet ud fra sin andel af udskilte oxygenradikal skadede nukleobaser i urinen (1) og dels på det mutagene potentiale. 8-oxodG-indholdet i lymfocyt-DNA og i døgnurinudskillelsen er to kompletterende parametre, der anvendes til at karakterisere kinetikken af 8-oxodG i mennesket (1). 8-oxodG-niveauet i lymfocyt-DNA (ca. 1 per  $10^5$  dG) anvendes som surrogatmarkør for *steady state* indholdet i utilgængelige væv (1). Dette niveau bestemmes af balancen mellem, hvor hurtigt basemodifikationer dannes og fjernes fra DNA.

Vurderet over et bredt aldersspektrum sker der ingen større akkumulation af 8-oxodG i humant væv (1) i forhold til den konstante daglige induktion af skader. Gennemsnitlige akutte stigninger i DNA skade efter oxidativt stress er typisk op til 50% ved tobaksrygning og op til 8-fold induceret med 2-nitropropan, men vender tilbage til udgangsniveauet inden for få timer som følge af DNA-reparation (1). Idet den kodende del kun udgør omkring 1% af total cellulært DNA kan disse gennemsnitsværdier dække over langt større genspecifik variation i oxidationsrate (4). Der er eksperimentel evidens for at visse basepositioner (*oxidations hot spots*) i de kodende regioner er særlig udsatte for oxygenradikal skade (4). Tilsvarende er karakteristiske *mutations hot spots* og kromosomalt rearrangement beskrevet for cancer og som aldersfænomen (4).

Udskillelsen af modificerede baser i døgnurin bruges som et mål for den totale mængde nukleobasemodifikation i kroppen per døgn (1). Den individuelle variation i urinindhold af 8-oxodG er ca. 7-fold med hovedparten af værdierne inden for intervallet 200-600 nmol/kg $\times$ 24 h (1). Fra disse tals-tørrelser er det estimeret, at der i gennemsnit modificeres omkring 50.000 nukleotider ud af et genom på ca.  $3,5 \times 10^9$  baser per celle per dag i den menneskelige organisme (1). Også disse gennemsnitsværdier dækker imidlertid over større forskelle i organspecifikke bidrag.

### Eksogene bidrag til oxidativ DNA-beskadigelse

Mange kemiske og fysiske miljøpåvirkninger øger den endogene dannelse af reaktive oxygenradikaler og dermed antallet af nukleobaseskader. Samtidig kan eksogene faktorer være direkte kilder til oxidative modifikationer af cellulære makromolekyler. 8-oxodG-udskillelsen bliver i den sammenhæng anvendt som biomarkør i forsøg på at kunne forudsige det karcinogene potentiale af miljøfaktorer (5). Således er det vist, at 8-oxodG-udskillelsen i døgnurin hos rygere er omkring 50% højere end hos ikkerygere (5). Polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH), N-nitrosaminer og metaller er blot nogle af flere tusinde stoffer i tobaksrøg, der kan øge 8-oxodG-dannelsen (5).

Oxygenradikaler kan også induceres ved fotoexcitation. Et organisk molekyle, der absorberer synligt lys eller UV-stråling, bliver exciteret ved elektronoverførsel til en højere orbital, hvorved et frit radikal opstår. Det frie radikal med en uparret elektron kan, hvis det eksisterer længe nok, videregive sin radikalstatus til andre substrater og derved inducere sekundære reaktioner (6). En række lægemidler (fx phenothiaziner, tetracycliner, thiazider, amiodarone, fluoroquinoloner) har fotoexciterende egenskaber, når de bestråles ved bølgelængder, som de absorberer (6), og kan derfor være potentielt mutagene.

### Det antioxidative forsvar

Til at beskytte arvemassen mod frie radikaler dannet in vivo har aerobe organismer udviklet antioxidative forsvarsmekanismer af enzymatisk og non-enzymatisk karakter. Hydroxylradikalet er et af de mest reaktive kemikalier, der kendes, og lader sig ikke fjerne effektivt ved specifikke *scavengers*. Det antioxidative forsvar tjener i stedet til at minimere dannelsen af  $\text{OH}^\bullet$  (2). De antioxidative enzymer omfatter superoxid-dismutase, som omdanner superoxid til hydrogenperoxid. Glutathion-peroxidase, katalaser og peroxidaser omdanner hydrogenperoxid til vand. Glutathion-reductase og ascorbate-dehydrogenase gendanner de reducerede former af de anti-oxidante co-faktorer glutathion og vitamin C (askorbinsyre). Ikke-enzymatiske faktorer i det antioxidative forsvar er bl.a. glutathion, metal kelatorer, vitamin E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamin A (betacaroten), vitamin C (askorbinsyre) og urinsyre. Glutathion tjener som co-faktor for glutathion-peroxidase og inaktiverer desuden reaktive lægemiddelintermediaerer dannet ved bioreduktion af den allestedsværende glutathion-redoxcyklus. Glutathion virker endelig som direkte *scavenger* af oxygenradikaler. Metal kelatorer forhindrer overgangsmetaller i at katalysere fri oxygenradikal dannelse (2).

### DNA-reparationssystemer

På trods af effektive antioxidative systemer, induceres der kontinuert oxidative skader i alle cellers makromolekyler. En forskydning i den prooxidante/antioxidante balance til fordel for den første vil medføre et oxidativt stress på cellens arvemasse. Alle typer celler indeholder reparationsenzymmer, der til stadighed overvåger DNA og den tilhørende substratpool og specifikt genkender og reparerer eller eliminerer de oxygenradikal inducerede nukleotidmodifikationer.

Endnu er det kun delvist forstået, hvilken rolle de forskellige typer af reparationssystemer i pattedyrceller har i forhold til hinanden under fysiologiske omstændigheder, men de enkelte systemer er i hovedtræk beskrevet. For oversigtens skyld er reparationssystemet rettet mod andre skader end oxidative DNA-skader også taget med.

#### Eliminering af modificerede nukleotider fra DNA-substrat pool

Deoxynukleotid-trifosfater med snævert substratspektrum screener og fjerner oxiderede nukleotid-trifosfater fra DNA-substrat poolen og forhindrer dermed indbygning af modificerede deoxynukleotider i DNA'et. Et eksempel er human hMTH1, der katalyserer hydrolyse af 8-oxodGTP til den korresponderende monofosfat (7).

#### Direkte reparation af modificeret DNA

Direkte reparation er en enzymatisk enkelttrins gendannelse af den oprindelige base in situ i DNA. Eksempler herpå er O<sup>6</sup>-methylguanin-metyltransferase (MGMT), som overfører methylgruppen fra O<sup>6</sup>-methylguanin og andre alkylerede substrater til en specifik cystein i enzymet (8).

DNA-photolyase katalyserer brud af DNA-intrastrængtværbindinger mellem pyrimidindimerer som thymidindimerer og 4,6-cyclobutan, der opstår ved direkte UV-stråling (6).

#### Base excisions reparation

Langt de fleste abasiske sites, deoxyribose- og baseskader af oxidativ og ikke-oxidativ karakter reparerer ved base excisions reparation (BER). I første trin brydes bindingen mellem base og deoxyribose af DNA-glycosylaser og efterlader abasiske sites (AP). Enkelte af DNA-glycosylaserne har kun glycosylaseaktivitet (monofunktionelle) og må komplementeres af en AP-endonuklease, mens de bifunktionelle glycosylaser har en lyaseaktivitet, der bryder fosforibosylbindinger og dermed DNA-strengen. Når DNA-strengen er brudt, sker den videre reaktion ved enten enkelt (*short patch*) eller flerfold (*long patch*) nukleotidreparation med DNA polymerase og -ligase. Det er ikke klart, hvorledes disse reguleres under fysiologiske omstændigheder.

Eksempler på humane glycosylaser er thyminglycol-glycosylase (hNth1), 8-oxodG-glycosylase (hOOG1), uracil-DNA-glycosylase og 3-metyladenosin-glycosylase (ANPG).

#### Mismatch reparation

En defineret underinddeling af base excisions reparation omfatter elimination af den ikke-modificerede base i et *mismatch* basepar via en DNA-glycosylase. Et eksempel på en sådan *mismatch* glycosylase er human adenine *mismatch*

glycosylase hMYH, der fjerner fejlagtigt indbygget deoxyadenin fra dA:8oxodG-basepar. Hvis dA:8oxodG-baseparret ikke reparerer før replikation, fører det til en mutation af typen G:C til A:T transversion. Andre eksempler på *mismatch* glycosylaser er uracil-DNA-glycosylase (UDG) og GT *mismatch* glycosylase.

Udover BER *mismatch* reparation findes der et specielt *mismatch* reparationssystem, der genkender og eliminerer misparrede normale baser fra DNA'et. Det mammale *mismatch* enzym hMSH2, genkender alle normale basefejlparringer, 1-12 base *loops* og desuden visse *mismatch*, der involverer beskadigede baser som for eksempel O<sup>6</sup>-methylG:T, O<sup>6</sup>-methylG:C og O<sup>4</sup>-methylA:A. Det formodes, at hMSH2-enzymet genkender sine substrater på den anormale struktur, der opstår af fejlparringen. Efter genkendelse af og binding til et mismatch screener hMSH2 DNA-strengen bidirektionelt efter et strengbrud, der virker som signal og initierer exonukleolytisk aktivitet. Resultatet bliver et hul i strengen på over 1.000 nukleotider (9). Resyntese og ligering sker via DNA-polymerase og DNA-ligase.

#### Nukleotid Excisions Reparation

Nukleotid excisions reparation (NER) er en kompleks reaktion, der over flere trin bryder en fosfodiesterbinding på hver side af DNA-læsionen og via en DNA-helicase frigør et 27-29' mer oligonukleotid indeholdende det modificerede nukleotid (10). Hos mennesket involverer alene genkendelse og incision af DNA-beskadigelsen mindst 14 forskellige proteiner, i tre præ-incisionskomplekser (10). NER er den eneste reparationsvej til at fjerne højmolekylære addukter fra DNA, som for eksempel benzo[a]pyrenediolepoxide-addukter fra tobaksrøg, aflatoxin-addukter fra svampeinficerede fødevarer og psoralen- og cisplatin-addukter. Også mindre basemodifikationer som for eksempel 8-oxodG kan fjernes ad denne vej, men NER-reaktionsvejen er kvantitativt mindre end BER under fysiologiske omstændigheder (11).

Nukleotid excisions reparation opdeles i to typer der, betegnes transskriptionskoblet reparation (TCR) og global genomreparation (GGR). Mutationer i gener, der koder for polypeptider, som indgår i disse reparationsveje, forårsager de sjældne arvelige lidelser xeroderma pigmentosum (XP), Cockaynes syndrom (CS) og en fotosensitiv form af trikotiodystrofi (PIBIDS). XP er karakteriseret ved overfølsomhed for solens UV-lys og prædisponering for hudcancer. PIBIDS kommer til udtryk som udviklingsdefekter og mental retardering. XP- og PIBIDS-patienter har typisk defekter i proteiner, der medvirker i begge underinddelinger af NER, mens CS-patienter kun har defekter i TCR-reparationsvejen. De dominerende kliniske manifestationer er neuronal degeneration og tidlig ældning (12). Det er ikke afklaret, hvilke baseskader der er kritiske for udvikling af de neurologiske defekter. Genetisk defekt af en helicase er årsag til det sjældne Werners syndrom, der som CS er karakteriseret ved accelererede ældningsfænomener.

#### Transskriptionskoblet reparation (TCR)

Mange typer af DNA-beskadigelse bliver i mammale celler repareret hurtigere i transskriptionelt aktive gener end i in-

aktive gener, og niveauet af oxiderede baser på den transkriberede streng i et aktivt gen er kun omkring en tiendedel af niveauet for den komplementære streng (12, 13). Dette fænomen skyldes den transskriptionskoblede reparation, der initieres via et kompleks af RNA-polymerase II (RNAPII) og CSA- og CSB-protein komplekser, der binder til DNA-læsionerne. NER-proteiner som TFIIH, XP-proteiner, RPA og ERCC1 rekrutteres herefter og reparerer skaderne (12, 13).

#### Mitochondriel DNA-reparation

På grund af den oxidative fosforylering har mitokondrielt DNA en oxidations- og mutationsrate der er ti gange større end den for nukleært DNA. Det er i de seneste år blevet klart, at mitokondrierne er i stand til at reparere en lang række baseskader (12). Som eksempel findes mindst fire subtyper af human OGG1 i høj aktivitet i mitokondrier (14). Desuden indeholder mitokondrier hMTH. Mens der således er enzymaktivitet over for oxidative baseskader er der ikke en mekanisme til reparation af UV-inducerede pyrimidinmodifikationer i mitokondrierne.

Komplekse DNA-skader som cisplatin-tværbindinger mellem DNA-strengene og højmolekylære addukter kan repareres i mitokondrielt DNA. Som anført reparerer disse skader i kernen via NER-reparation. NER-systemet findes imidlertid ikke i mitokondrier. Som hypotese er disse fænomener forklaret ved rekombinatorisk reparation, der forudsætter en intakt komplementær kopi af den beskadigede DNA-sekvens. Ingen af proteinerne i denne reparationsvej er klonet hos mennesket (12).

#### Programmeret celledød

Den ultimative måde at skille sig af med en byrde af oxygenradikal modificerede nukleotider, der er for stor til at kunne repareres, er at igangsætte en organiseret disintegration af cellen kaldet apoptose eller programmeret celledød. Proteiner som blandt andet P53, Bcl-2 og Bax er involverede (15). Organismen kan på den måde eliminere potentielle cancer-celler til fordel for hele organismens overlevelse.

#### DNA-skade og aldring

Det er klart, at hverken det antioxidative forsvar eller den ekstensive reparation af baselæsioner kan yde fuld beskyttelse mod de skadelige effekter af frie oxygenradikaler og andre kemiske forbindelser på DNA. Der sker med alderen en tiltagende ophobning af mutationer i og rearrangement af DNA (16), hvilket formodes at inaktivere individuelle gener og føre til delvist kontroltab af cellernes metabolisme. På denne baggrund kan cellerne enten få et ukontrolleret vækstmønster, degenerere og gå til grunde eller nå et funktionelt slutstadium som aldringsfænomen. Det er foreslået, at denne akkumulering af fri radikal-medieret cellulær skade kan være en betydende faktor for de fysiologiske ændringer, der er associeret med ældningsprocessen i »DNA-skade akkumulerings hypotesen«. Endvidere er der teorier om, at ophobningen helt eller delvist skyldes et generelt fald i DNA-reparation. Enkelte syndromer med genetiske defekter i DNA-reparationssystemet og deraf følgende aldersassocierede symptomer er beskrevet tidligere. Disse syndromer

er imidlertid meget sjældne og har primært akademisk interesse. Kvantitative forskelle i reparationsevne i befolkningen er ikke tilsvarende belyst. Genotypiske polymorfier i reparationssystemerne med fænotypisk reduceret reparationsevne kan udgøre en langt større population, som af den grund kan være disponerede for tidlig ældning og udvikling af cancer og degenerative sygdomme som aterosklerose, neurodegenerative og inflammatoriske lidelser.

Ved forsøg med gen-knockout-mus, der mangler gener for specifikke reparations enzymer, er der gjort betydelige fremskridt i forståelsen af enzymernes specificitet og relative bidrag til reparation in vivo. Det er især interessant at få afklaret betydningen af manglende reparation af specifikke basemodifikationer for udvikling af sygdom og for tidlig aldring.

#### Forebyggelse af oxidativ DNA-skade

Der forskes intensivt i at finde og karakterisere stoffer som kan hæmme dannelsen af reaktive oxygenradikaler og dermed reducere oxidativ DNA-skade og dens følger. Der er epidemiologisk evidens for, at grøntsager og frugt indeholder stoffer med disse egenskaber. Disse forbindelser, der generelt betegnes fyto-kemiske stoffer, omfatter for eksempel carotenoider, askorbinsyre,  $\alpha$ -tocopherol, selen, flavonoider, glucosinolater, isothiocyanoater, glucoraphanin og forskellige fenoler (17). De virker bredt for eksempel på ændring af colommiljøet, øget elimination af oxygenradikaldannende stoffer ved induktion af glucuronidering (fase II), antioxidant effekt via direkte reaktion med frie radikaler og optimering af normal DNA-reparationsaktivitet. Grøntsager fra korsblomstfamilien (*Brassica*), der bl.a. omfatter rosenkål, broccoli og kål, har fået en vis opmærksomhed i denne sammenhæng. Rosenkål eller ekstrakt heraf kan reducere den oxidativ DNA-skade såvel dyreeksperimentelt som i humane studier, vurderet ud fra den reducerede urinudskillelse af 8-oxodG (18). De bioaktive substanser i rosenkål er endnu ikke identificerede. En anden af de korsblomstrede grøntsager, broccoli, kan inducere aktiviteten af antioxidante enzymer (glutathion peroxidase, glutathion reductase og superoxid dismutase). Broccolispirer er en særlig rig kilde på glucoraphanin, som er en af de bioaktive forbindelser, der inducerer fase II-detoxifikationsenzymer (glucuronosyltransferase, glutathiontransferase og NADPH-quinonreduktase) (19). Effekten af kostfaktorer på DNA-reparationsaktiviteten er efter vor viden sparsomt belyst.

Funktionelle fødevarer kan forventes at tage stadig større markedsandele i de kommende år, og der er i den forbindelse behov for at få karakteriseret fødevarernes antioxidative og reparationsinducerende funktionalitet.

Endvidere er der udviklet lægemidler fx tirilazad (Free-dox) med direkte antioxidativ effekt.

#### Perspektiver i dansk forskning i oxidativ DNA-skade

Som anført er der beskedne gennemsnitlige ændringer i basemodifikationsniveauer i tilgængeligt humant materiale, hvilket skærper kravene til analyse-sensitivitet og -specificitet. Til forskel fra fx UV og elektrokemisk detektion er det med massespektrometri muligt at identificere basemodifikationer ud fra deres egen og fragmentationernes masse. Der er

imidlertid betydelig interanalysevariation mellem forskellige massespektrometrisk baserede metoder. Således er gaskromatografisk massespektrometri tilbøjelig til at overestimere analyseværdier. Antagelig sker der en betydelig artefaktdannelse, fordi denne metode kræver, at DNA-baserne derivatiseres for at kunne komme på gasform.

HPLC-triple-quadrupol-massespektrometri er en relativ ny teknologi til kvantitering af nukleotidmodifikationer, der anvendes på klinisk farmakologisk afd. Q, RH. Analyseprincippet er søjlekromatografi efterfulgt af ionisering, masseselektion, fragmentering, ny masseselektion og detektion. Følsomheden på ca. 20 Fmol er formentlig tæt på det maksimalt opnåelige på massespektrometeret. Den kromatografiske del tjener til at bortselekttere en stor del af de irrelevante stoffer, der udgør baggrundssignal, og samtidig kan analysestoffet opkoncentreres på kolonnen. Dette sidste faktum ventes at kunne bidrage væsentligt til forbedring af analyse sensitiviteten. Ved anvendelse af bestemte kolonnematerialer synes der at være en mulighed for at øge sensitiviteten således, at den teoretisk kun er begrænset af mængden af prøvemateriale. Til LC-MS analysen derivatiseres prøverne ikke, og et minimum af prøveforberedelse i øvrigt reducerer risikoen for artefaktdannelse betydeligt. Isotopmærkede basemodifikationer analyseret i samme kromatogram tjener som interne standarder. Under optimale betingelser er der med denne metode en standarddeviation på ca. 5%.

### Konklusion

Oxidativ DNA-modifikation er en potentiel vigtig aldringsmekanisme. Der findes nu molekylærbiologiske og fysisk-kemiske metoder, hvormed det kan afgøres kvantitativt, hvor betydende denne mekanisme er hos mennesket og hvilke faktorer, der er bestemmende for den kumulative DNA-skade, herunder især hvilke faktorer, endogene som ekso-gene, der kan påvirkes mhp. at minimere aldersrelaterede organforandringer.

Reprints not available. Correspondence: Søren Astrup Jensen, klinisk farmakologisk afdeling Q, H:S Rigshospitalet, DK-2200 København N. E-mail: sastrup@rh.dk

### Litteratur

- Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative damage in man. *J Mol Med* 1996; 74: 297-312.
- Dizdaroglu M. 1, Mechanisms of free radical damage to DNA. I: Aruoma OI, Halliwell B, eds. *DNA and free radicals: techniques, mechanisms and applications*. London: OICA International, 1998: 3-26.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991; 349: 431-4.
- Rodriguez H, Drouin R, Holmquist GP, Akman SA. A hot spot for hydrogen peroxide-induced damage in the human hypoxia-inducible factor 1 binding site of the PGK 1 gene. *Arch Biochem Biophys* 1997; 338: 207-12.
- Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2241-7.
- Epe B. 3, DNA damage induced by photosensitizers and photoreactive compounds. I: Aruoma OI, Halliwell B, eds. *DNA and free radicals techniques, mechanisms and applications*. London: OICA International, 1998: 63-86.
- Maki H, Sekiguchi M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 1992; 355: 273-5.
- Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88: 1346-60.
- Kruse R, Lamberti C, Wang Y, Ruelfs C, Bruns A, Esche C et al. Is the mismatch repair deficient type of Muir-Torre syndrome confined to mutations in the hMSH2 gene? *Hum Genet* 1996; 98: 747-50.
- Mu D, Wakasugi M, Hsu DS, Sancar A. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem* 1997; 272: 28971-9.
- Friedberg EC, Bardwell AJ, Bardwell L, Wang Z, Dianov G. Transcription and nucleotide excision repair - reflections, considerations and recent biochemical insights. *Mutat Res* 1994; 307: 5-14.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25409-12.
- Bohr VA. Gene specific DNA repair. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1983-22.
- Kohn T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219-25.
- Rhys CMJ, Bohr VA. Mammalian DNA repair responses and genomic instability. I: Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla B, eds. *Stress-inducible cellular responses*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1996: 289-305.
- Bohr VA, Anson RM. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutat Res* 1995; 338: 25-34.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1027-39.
- Deng X, Tuo J, Poulsen HE, Loft S. Prevention of oxidative DNA damage in rats by brussels sprouts. *Free Radic Res* 1998; 28: 323-33.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10367-72.

Artiklen er skrevet i anledning af  
Det Internationale År for Ældre 1999