

**KLİNİK ÇALIŞMA**

## Larenks karsinomlu hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan seviyeleri

### Lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with laryngeal carcinoma

Dr. Yavuz Fuat YILMAZ,<sup>1</sup> Dr. Filiz AKBIYIK,<sup>2</sup> Dr. Ümit TUNCEL,<sup>1</sup> Dr. Adnan ÜNAL<sup>1</sup>

**Amaç:** Serbest oksijen radikalleri (SOR) kanser patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada larengeal kanser dokusunda lipid peroksidasyonu ve SOR seviyeleri araştırıldı.

**Hastalar ve Yöntemler:** Larenks skuamöz hücreli karsinomlu 30 hastada larengeal tümörlü ve tümörsüz dokuda glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve lipid peroksidasyonu değerleri karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Glutatyon seviyesi kanserli dokuda belirgin olarak düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Kanserli dokularda lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA seviyelerinde belirgin artış saptandı ( $p<0.01$ ). Erken ( $n=14$ ) ve ileri ( $n=16$ ) evre tümörlü hastalardan elde edilen sonuçlar arasında MDA ve GSH düzeyleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Larenks kanserli dokuda antioksidan sistemdeki azalma, serbest oksijen radikallerinin artmasına yol açarak lipid peroksidasyonunda artışla sonuçlanmaktadır. Serbest oksijen radikallerindeki bu artış kanser patogenezinde rol oynayabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Antioksidan/metabolizma; skuamöz hücreli kanser; serbest radikal.

**Objectives:** Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the pathogenesis of cancer. The aim of this study was to investigate the extent of lipid peroxidation and ROS in laryngeal cancer tissues.

**Patients and Methods:** We determined glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) activities as markers of lipid peroxidation in laryngeal tumor specimens and tumor-free adjacent tissues of 30 patients with squamous cell carcinoma.

**Results:** Compared to the tumor-free specimens, the level of GSH was significantly low ( $p<0.001$ ) whereas MDA, a lipid peroxidation product, showed a significant increase ( $p<0.01$ ) in cancer tissues. No significant differences were found in MDA and GSH levels between patients with early ( $n=14$ ) and advanced ( $n=16$ ) tumor stages ( $p>0.05$ ).

**Conclusions:** Decreased antioxidant capacity of laryngeal cancer tissues results in elevation of free oxygen radicals and increased lipid peroxidation. Free radical metabolism may be involved in the pathogenesis of laryngeal cancers.

**Key Words:** Antioxidants/metabolism; carcinoma, squamous cell; free radicals.

Organizmadaki bütün hücreler antioksidan savunma sistemleri aracılığıyla serbest oksijen radikallerinin (SOR) muhtemel zararlarına karşı koy-

maktadırlar. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres ile sonuçlanarak, hücrel

- 
- <sup>1</sup>Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği (Department of Otolaryngology, Ankara Numune Training and Research Hospital); <sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (Department of Biochemistry, Medicine Faculty of Hacettepe University), Ankara, both in Turkey.
  - Dergiye geliş tarihi - 1 Temmuz 2005 (Received - July 1, 2005). Düzeltme isteği - 13 Nisan 2006 (Request for revision - April 13, 2006). Yayın için kabul tarihi - 1 Haziran 2006 (Accepted for publication - June 1, 2006).
  - İletişim adresi (Correspondence): Dr. Yavuz Fuat Yılmaz, Fatih Cad., No: 178/10, 06290 Keçiören, Ankara, Turkey. Tel: +90 312 - 508 52 02 Faks (Fax): +90 312 - 381 80 50 e-posta (e-mail): dryavuzfuatylmaz@mynet.com

fonksiyonlarda bozulmaya yol açmakta ve kanser gibi patolojik durumlara neden olmaktadır.<sup>[1]</sup> Ortamdan uzaklaştırılmayan yüksek SOR konsantrasyonlarının DNA hasarı yapıp mutasyona neden olduğu ve bunun da tümör gelişimini artırdığı bilinmektedir.<sup>[2,3]</sup> Oksidatif stres hipotezine göre, birçok karsinojen serbest radikaller oluşturarak hücre hasarına ve hasarlanan hücrelerin malign dönüşümüne yol açabilir. Serbest oksijen radikalleri birçok hücrel ve moleküler etkileriyle mutajenite, sitotoksitate, gen ekspresyonunda bozulma sonucunda karsinogenezisin başlamasına yol açmaktadır.<sup>[2-4]</sup>

Ultraviyole ışını, iyonize radyasyon, kimyasal karsinojenler ve sigara kullanımı organizmalarda oksidatif stresi indükleyebilmektedir. Birçok hücrede antioksidan savunma mekanizmaları iki kısımdan oluşmaktadır: Bunlar süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidazdan oluşan antioksidan enzimler ile vitamin A, E, askorbat, glutatyon ve tioredüksin gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardır. Bu maddeler endojen ve ekzojen çevresel faktörlerce oluşturulan SOR'lerine karşı savunma mekanizmasını oluştururlar.<sup>[5]</sup>

Serbest oksijen radikalleriyle indüklenmiş lipid peroksidasyonu (LP), hücre membran fonksiyonunda ve yapısında büyük değişikliklere yol açmakta ve neoplastik transformasyonda suçlanmaktadır.<sup>[6]</sup> Lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehitdir (MDA) ve MDA'nın nükleik asitlerle etkileşime girerek mutagenesis ve karsinogeneze yol açtığı gösterilmiştir.<sup>[7]</sup> Glutatyon (GSH) ise önemli bir SOR temizleyicisi olan glutatyon peroksidazın substratıdır. Glutatyon, aktive oksijenlerin temizlenmesinde ve hidrojen atomlarının hedef radikallere transferinde rol almaktadır.<sup>[8]</sup>

Literatür incelememizde LP ve larengeal kanserde antioksidan durum ile ilişkili sınırlı sayıda çalışma vardır ve sonuçları çelişkilidir.<sup>[3,8-14]</sup> Bu çalışma larengeal kanserde LP'nin yaygınlığını ve dokudaki antioksidan seviyelerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmada larenks skuamöz hücreli kanser tanısı ile Ekim 2001-Mayıs 2002 tarihleri arasında ameliyat edilen 30 erkek hastadan (ort. yaş 58±8; dağılım 40-84) elde edilen dokular kullanıldı. Taze histopatolo-

jik dokular hem tümöral, hem de larengeal nontümöral mukozadan elde edildi. Kontrol dokuları tümörden uzak bölgelerden alınıp bir kısmı neoplastik değişikliğin olmadığını göstermek için histopatolojik incelemede, diğer kısmı ise biyokimyasal analizde kullanıldı. Elde edilen tüm dokular -70 derecede derin dondurucuda saklandı. Tüm kanser hastaları 15-25 yıllık sigara içicisi olup beşi hariç diğerleri orta derecede alkol kullanmaktaydı. Tüm evrelemesi AJCOC ölçütlerine göre yapıldı.<sup>[11]</sup> Hastalığın evresine göre uygun cerrahi girişim (total ve parsiyel larenjektomi) gerçekleştirildi.

## Biyokimyasal analiz

Tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) Uchiyama ve Mihara yöntemiyle LP'nin bir indeksi olarak ölçüldü.<sup>[15]</sup> Doku örnekleri 1:10 potasyum fosfat tamponunda (50Mm, ph 7.4) homojenize edildi. 0.5 ml homojenat 3 ml'lik %1 fosforik asit ve 1 ml %0.6 TBA ile karıştırıldı. Tüpler 45 dakika kaynayan suda tutuldu ve soğuduktan sonra TBARS'den n-butanol ekstrakte edilerek absorbansı 532 nm olarak okundu. Tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri her gram ıslak doku için nanomol olarak verildi. Azalmış glutatyon (GSH) total sülfidril gruplarından Elman reajeni kullanılarak ölçüldü (DTNB). Doku homojenatı yukarıda tanımlandığı gibi deproteinize ve 0.7 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile nötralize edildi. Son presipitat santirifüjle alındı ve süpernatant GSH tanımlamasında kullanıldı.<sup>[16]</sup> Glutatyon seviyeleri gram başına milimol ıslak doku olarak tanımlandı.

## İstatistiksel analiz

Tüm değerler ortalama±standart sapma (SS) olarak tanımlandı. Normal ve kanser doku örnekleri arasındaki tanımlanan parametrelerin istatistiksel anlamlılığı paired t-testi ile analiz edildi. Erken ve

TABLO I  
LARENKS KANSERLİ HASTALARIN TÜMÖRLÜ VE TÜMÖRSÜZ DOKULARINDAKİ MDA VE GSH SEVİYELERİ

	Tümörlü doku	Tümörsüz doku	p
	Ort.±SS	Ort.±SS	
Malondialdehit	32.76±12.17	21.88±9.38	p<0.01
Glutatyon	0.059±0.063	0.18±0.11	p<0.001

MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; İstatistiksel analiz paired t-testi ile yapıldı.

TABLO II  
EVRELERİNE GÖRE HASTALARIN MDA VE GSH SEVİYELERİ

Evre	Tümörlü doku	Tümörsüz doku	Tümörlü doku	Tümörsüz doku
	MDA	MDA	GSH	GSH
	Ort.±SS	Ort.±SS	Ort.±SS	Ort.±SS
Erken evre (n=14)	29.84±10.36	20.35±11.05	0.06±0.07	0.16±0.12
İleri evre (n=16)	31.74±13.59	22.90±0.26	0.04±0.05	0.18±0.12

MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; İstatistiksel analiz Mann Whitney U-testi ile yapıldı.

ileri evre tümörlü dokudaki değerlerin istatistiksel analizleri Mann-Whitney U-testi ile yapıldı.  $P < 0.05$  sayısal değerleri anlamlı olarak değerlendirildi.

### BULGULAR

Kanser dokusunda yüksek LP seviyeleri saptandı ( $p < 0.01$ ). Kanserli doku GSH seviyeleri ise belirgin olarak düşük bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo I).

Hastaların 14'ü evre 2 ( $T_2M_0N_0$ ), 10'u evre 3 ( $T_3N_0M_0$ ) ve altısı evre 4 ( $T_4N_0M_0$ ) idi, hiçbirinde uzak metastaz yoktu. Evre 2 erken evre, 3 ve 4 ise ileri evre olarak değerlendirildi. Erken ve ileri evre tümörlü hastalardan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo II).

### TARTIŞMA

Serbest oksijen radikali üretiminin larenks skuamöz hücreli kanserdeki kaynağı, muhtemelen iyonize radyasyon, kimyasal karsinojenler ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerdir. Tütün kullanımının larenks kanserine predispozan faktör olduğu bilinmektedir. Tütün kullanımı aynı zamanda enflamatuvar durumlara yol açarak, enflamatuvar hücrelerce oluşturulan SOR ile oksidatif strese yol açabilir.<sup>[10]</sup>

Kanserli dokularda SOR fazlalığı ve buna bağlı olarak oksidatif stresin SOR artışı yönünde bozulmasının LP'yi ve karsinogenezisi indüklediği gösterilmiştir.<sup>[1,9]</sup> Lipid peroksidasyonunun artması ortamda MDA birikmesine neden olmaktadır.<sup>[7]</sup> Deneysel hayvan ve insan çalışmalarında LP'nin ve biriken metaboliti MDA'nın kanserin başlangıç ve ilerleme safhasında önemli bir role sahip olduğunu gösteren araştırmalar vardır.<sup>[4,12,17]</sup> Malondialdehitin bu zararlı etkisini nükleik asitlerle etkileşime girerek yaptığı gösterilmiştir.<sup>[7]</sup>

Larenks kanserlerinde bu konuda az sayıda çalışma vardır. Durak ve ark.nın<sup>[9]</sup> çalışmasında larenks

skuamöz hücreli kanserlerinde düşük antioksidan aktivite gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz, adenozin deaminaz, 5 nükleotidaz, ksantin oksidaz ve katalaz gibi enzim seviyeleri bu aktiviteyi yansıttıkları için kullanılmıştır. Ancak, bu azalmış antioksidan aktivite normal larengeal dokuda izlenememiştir. Samir ve Kholy<sup>[18]</sup> larengeal kanserde MDA seviyelerinde belirgin artış göstermişler ancak, tümör evresi, diferansiyasyon derecesi veya lenf nodu metastazıyla ilişki saptayamamışlardır. Çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak erken ve ileri evre kanserli dokular arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanamamıştır ( $p > 0.05$ ). Seven ve ark.<sup>[19]</sup> plazma TBARS değerlerine bakarak LP'nin larengeal kanserli hastalarda, kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ancak, Yiğitbaşı ve ark.<sup>[20]</sup> larenksin kanserli dokusunda MDA seviyelerinde anlamlı değişiklikler bulamamışlardır.

Çalışmamız, doku TBARS değerleri olarak LP'nin, kanserli dokularda, kansersiz dokuya kıyasla belirgin derecede yüksek olduğunu göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun artması SOR-antioksidan sistem dengesinin, SOR lehine bozulması nedeniyle olabilir.

Çalışmamızda glutatyon seviyelerinin tümörlü dokuda tümörsüz dokuya kıyasla düşük olduğu görüldü. Bu bulgu diğer araştırmacılarla örtüşmektedir.<sup>[13,18]</sup> Bu azalmanın, artan SOR miktarına bağlı GSH kullanımındaki artışa bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, SOR artışı nedeniyle antioksidan sistem enzimlerinin kullanımı artmakta dolayısıyla GSH seviyeleri düşmektedir. Oksidan-antioksidan sistem dengesinin bozulması (oksidatif stres) nedeniyle de LP ve buna bağlı olarak MDA kanserli dokuda artmaktadır. Bu nedenle, SOR artışı ve/veya antioksidan enzim düşüklüğüne bağlı oksidan streste artış larenks kanseri patogeneğinde önemli bir rol oy-

nuyor olabilir; ancak, konunun açıklığı kavuşması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### KAYNAKLAR

1. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999;77:658-66.
2. Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 1989; 7:149-59.
3. Kinsler TW, Taffe BG. Free radicals in tumor promotion. *Adv Free Rad Biol Med* 1986;2:347-88.
4. Comstock GW, Alberg AJ, Huang HY, Wu K, Burke AE, Hoffman SC, et al. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acid, carotenoids, alpha-tocopherol, selenium, and total peroxyl radical absorbing capacity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:907-16.
5. Perchellet JP, Perchellet EM. Antioxidants and multi-stage carcinogenesis in mouse skin. *Free Radic Biol Med* 1989;7:377-408.
6. Borochoy H, Abbott RE, Schachter D, Shinitzky M. Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and lipid fluidity. *Biochemistry* 1979;18:251-5.
7. Farooqui MY, Day WW, Zamorano DM. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp Biochem Physiol B*. 1987;88:177-80.
8. Halliwell B, Gutteridge JM, editors. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press; 1989.
9. Durak I, Isik AC, Canbolat O, Akyol O, Kavutcu M. Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human laryngeal tissues. *Free Radic Biol Med* 1993;15:681-4.
10. Duthie GG, Arthur JR, James WP. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 1991;53(4 Suppl):1061-3.
11. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, editors. *American Joint Committee cancer Staging manual*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
12. Harris CC. Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 1989;10:1563-6.
13. Nachiappan V, Mufti SI, Eskelson CD. Ethanol-mediated promotion of oral carcinogenesis in hamsters: association with lipid peroxidation. *Nutr Cancer* 1993;20:293-302.
14. Namyslowski G, Nowinska E, Danch A, Drozd M, Wojcik A, Posielezna B, et al. A study of erythrocyte oxidative enzyme activity in patients with laryngeal cancer before and after treatment with a selenium preparation CEROSSEL. *Otolaryngol Pol* 1995;49 Suppl 20:93-6. [Abstract]
15. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978;86:271-8.
16. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27:502-22.
17. Birnboim HC. DNA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis* 1986;7:1511-7.
18. Samir M, el Kholy NM. Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1999;24:232-4.
19. Seven A, Civelek S, Inci E, Inci F, Korkut N, Burcak G. Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. *Clin Biochem* 1999; 32:369-73.
20. Yigitbasi OG, Guney E, Haghghi N, Dogan P, Saraymen R, Balkanli S. Oxidant and antioxidant status in larynx squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:447-51.