

Adenomatöz kolon polipli hastalarda oksidatif stres mekanizmasının paraoksonaz ve arilesteraz üzerinden değerlendirilmesi

Murat Aydın¹, Feti Tülübaş¹, İlhan Bali², Rafet Mete³, Mustafa Oran⁴, Oğuzhan Yıldırım³, Filiz Turan⁵, Ahmet Gürel¹

Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya¹, İç Hastalıkları⁴, Anestezi ve Reanimasyon⁵ Anabilim Dalları ve Gastroenteroloji³ Bilim Dalı, Tekirdağ

²Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu Afet ve Acil Yönetimi, Tekirdağ

Amaç: Adenomatöz polip, rektum ve kolonda adenomların lümenine doğru gelişimi ile karakterize klinik bir durumdur. Birçok dejeneratif ve tümöral hastalığın patogeneğinde artmış oksidatif stres rol oynamaktadır. Bu çalışma adenomatöz kolon polipli hastalarda paraoksonaz, indüklenebilir paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerinin tespiti ve oksidatif stres ile hastalığın patofizyolojisi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile planlanmıştır. **Gereç ve yöntem:** Namık Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran hastalardan kolon polipi saptananlar ve sağlıklı gönüllüler çalışmaya alındı. Paraoksonaz, indüklenebilir paraoksonaz ve arilesteraz düzeylerinin ölçümleri spektrofotometrik olarak yapıldı. **Bulgular:** Kolon polipli hastalar ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında, kolon polipli hastalarda, paraoksonaz, indüklenebilir paraoksonaz aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük bulunurken, arilesteraz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. **Sonuç:** Kolon polipli hastalarda paraoksonaz ve indüklenebilir paraoksonaz aktivitesinin sağlıklı polülasyondan düşük bulunması, oksidan-antioksidan dengenin oksidan yönünde bozulmasının polipli hastalarda polip gelişimi ile yakın ilişki içinde olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Adenomatöz kolon polipleri, paraoksonaz, indüklenebilir paraoksonaz, arilesteraz

The mechanism of oxidative stress in patients with adenomatous colon polyps, evaluation of the arylesterase and paraoxonase

Objectives: Adenomatous polyps is characterized by the development of adenomas into the lumen in the rectum and colon. Increased oxidative stress plays a role in many degenerative diseases and tumor pathogenesis. The aim of this study in patients with adenomatous colon polyps paraoxonase, stimulated paraoxonase and arylesterase detection and reveal the relationship between oxidative stress and pathophysiology of the disease. **Materials and methods:** Patients admitted to Namık Kemal University Research and Training Hospital Gastroenterology Clinic with adenomatous polyposis and healthy controls were studied. Paraoxonase, stimulated paraoxonase and arylesterase measurements were performed spectrophotometrically with manual methods. **Results:** The levels of paraoxonase and stimulated paraoxonase activity in patients with adenomatous polyps were found to be significantly lower than healthy controls, arylesterase activity were significantly higher than in healthy controls, but the difference was not statistically significant. **Conclusion:** A significant decrease in serum paraoxonase and stimulated paraoxonase activity lead to an increase in oxidative stress may play a role in the pathophysiology of adenomatous colon polyps.

Keywords: Adenomatous polyps, paraoxonase, stimulated paraoxonase, arylesterase

Giriş

Histolojik yapısına bakılmaksızın kolon mukozal yüzeyinden lümenine doğru çıkıntı yapan tüm lezyonlara polip adı verilir. Polipler batılı ülkelerde 60 yaş üzerindeki kişilerin

otopsilerinde %30 üzerinde tespit edilirken adenomatöz polipler bu sayının %5-10'unu oluştururlar. Yaş ilerledikçe bulunma sıklıkları artar ve erkeklerde kadınlardan daha fazladır. Genellikle asemptomatik seyreden adenomlar ancak kanama, anemi gibi komplikasyonlar oluşturunca fark edilirler (1). Adenom-karsinom dönüşmesi ile kolon kanserlerin bir kısmının izole adenomlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu dönüşüm yaklaşık 15 yıllık süre içinde oluşmaktadır. Adenomatöz polipler kolorektal kanserlere dönüşme riski itibarıyla dikkatle izlenmesi gereken bir klinik tablodur (2).

Yazışma Adresi:

Murat Aydın
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tekirdağ

E-posta: drmurataydin@hotmail.com

Tümör gelişiminde serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hücre hasarının ve genetik mutasyonların rolü yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (3,4). Hücre içi metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzim sistemi hassas bir denge halindedir. Ancak oksidan miktarının artması veya antioksidan sisteminin nispeten yetersizliği hücre ve doku hasarıyla sonuçlanmaktadır (5). Bu hasar özellikle hücre yapı taşlarının, genetik materyalin ve dokuların irreversibl dejenerasyonu ve kanser gelişimi ile ilişkilidir (6,7).

Paraoksonaz (PON) hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesine sahip glikoprotein yapıda bir enzimdir (8). Kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olan PON; PON1, PON2 ve PON3 şeklinde üç farklı yapıda olup 7q 21.3-22.1 kromozomunun uzun kolunda kodlanmaktadır (9). PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra HDL'nin yapısında yer alarak dolaşıma katılır (10). PON1'in antioksidan ve antiaterojenik etkileriyle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. PON1'in dolaşımdaki organofosfatların inaktive ettiği (11), LDL'nin lipid oksidasyonunu inhibe ettiği (12), platelet-aktive edici faktörü hidrolize uğrattığı (13) bildirilmiştir.

Adenomatöz polipte olası oksidatif hasarın mekanizmasının açıklığa kavuşturulması hastalığın tedavisi ve komplikasyonlarından kaçınmada önem kazanmaktadır. Bu çalışmada paraoksonaz, indüklenebilir paraoksonaz ve arilesteraz düzeylerinin kolon polipli hastalar ile sağlıklı kontroller arasında karşılaştırılması ve oksidatif stres metabolizmasında bu parametrelerin fonksiyonunun aydınlatılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve metod

Çalışma grubu

Gastroenteroloji Polikliniği'nde tıbbi endikasyonlar sebebiyle kolonoskopi yapılan hastalardan, biyopsi sonucu adenomatöz polip teşhisi konulanlar ile sağlıklı kişilerden gönüllük esasına göre oluşturuldu. Çalışmaya toplam 30 adenomatöz polip hastası ve 30 sağlıklı kontrol dahil edildi. Adenomatöz polip alt grupları dışında hamartomatöz, enflamatuvar veya hiperplastik gibi diğer polip tipi saptanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Ayrıca, endokrin veya metabolik hastalığı olanlar, akut ya da kronik enfeksiyonu olanlar, hipertansiyon ve aterosklerotik kalp hastalığı olanlar, renal hastalığı olanlar çalışma grubundan dışlandı. Ölçüm sonuçlarına etki etmeleri sebebiyle özellikle statin grubu olmak üzere hiperlipidemi tedavisi için kullanılan diğer ilaç gruplarını alan hastalar çalışmadan çıkartıldı. Kontrol grubu, benzer yaş ve cinsiyette sağlıklı gönüllülerden seçildi (Tablo 1).

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun izni ile yapılmıştır.

Biyokimyasal Ölçümler

Biyokimyasal ölçümler için 8 – 10 saat açlık sonrası sabah alınan venöz kan kullanılmıştır. Tüm ölçümler ticari kit kullanılarak Cobas C 501 Roche (Japonya) Biyokimya analizöründe yapılmıştır.

Serum PON aktivitesi ölçümü

PON1 enziminin paraoksonu hirolizi ile dietil fosfat ve p-nitrofenol oluşmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan p-nitrofenol konsantrasyonu kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. 2 mM Kalsiyum Klorür (CaCl₂) ve 2 mM paraoksan içeren reaktif karışım çözeltisi ile oluşturulan reaksiyonun, 412 nanometre (nm) dalga boyunda 3 dakikalık süredeki absorbans değişiminden PON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir (14). P-nitrofenol için molar absorbtivite katsayısı $\epsilon_{412} = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınmıştır. Aktivite birimi U/L olarak ifade edildi (15).

Serum indüklenebilir PON aktivitesi ölçümü

PON1 aktivite ölçümü ile aynı esasta yapılmaktadır. Ancak PON1 ölçümü sırasında kullanılan 2 mM Kalsiyum Klorür (CaCl₂) ve 2 mM paraoksan içeren reaktif karışım çözeltisine 1 M Sodyum Klorür (NaCl) eklenerek indüksiyon sağlanmaktadır. 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika inkübe edildikten sonra 412 nm. dalga boyunda 3 dakika süreyle absorbans değişiminden U/L olarak aktivite hesaplanmaktadır. P-nitrofenol için molar absorbtivite katsayısı $\epsilon_{412} = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı.

Serum arilesteraz aktivitesi ölçümü

PON1 enziminin fenil asetat substratı ile reaksiyonu kullanılarak arilesteraz aktivite tayini yapılmıştır. Fenil asetat hirolizi ile asetat ve fenol oluşmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan fenol konsantrasyonu kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. 2 mM CaCl₂ ve 2 mM fenil asetat içeren reaktif karışım çözeltisi kullanılarak oluşturulan reaksiyon, 25 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika inkübe edildikten sonra 270 nm dalga boyunda 3 dakika süreyle absorbans değişimi ölçülerek aktivite hesaplanmaktadır. Fenol için molar absorbtivite katsayısı $\epsilon_{270} = 1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınmıştır. Aktivite birimi U/L olarak ifade edildi (16)

İstatistiksel analiz

Tüm analizlerde SPSS 17.0 (Chicago, IL.) programı kullanıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov Testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada normal dağılım gösteren parametreler Student t testi ile normal dağılım göstermeyen parametreler Mann-Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. Sayısal değişkenler, ortalama±standart sapma veya medyan ile birlikte minimum-maksimum değerleri şeklinde ifade edildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

PON1 aktivitesi kontrol grubunda ortalama 142 U/L iken adenomatöz polipli hastalarda ortalama 27 U/L'ye düşerek anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,001$). İndüklenebilir PON1 aktivitesi kontrol grubunda 238 U/L iken adenomatöz polipli hastalarda ortalama 86 U/L'ye gerileyerek anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,001$) (Tablo 2). Arilesteraz aktivitesi kontrol grubunda ortalama 79757 U/L, kolon kanseri grubunda 108590 U/L olarak ölçüldü ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,07$).

Tartışma

Kolonik mukozanın yüzey epitel hücreleri 3-5 günde bir yenilenir. Bunun sebebi mukozanın bağırsak içeriğinde bulunan besin artıkları, oksidanlar, toksinler ve safra asitleri gibi irrite edici ajanlarla yoğun temasıdır (17). Kolon polip oluşumunun patofizyolojisinde dökülen hücreler yerine rejenere olan hücrelerin muhoza yüzeyine göçü sırasında bölünmenin kontrolsüz devam etmesi ve/veya bu hücrelerin dökülmeyi önleyen özellikler geliştirmesinin yattığı düşünülmektedir (18,19) Oksidatif stres artışının hücre hasarı ve mutasyonlar yoluyla bu süreçte katkıda bulunduğu kabul edilmektedir. Kolon poliplerinde oksidatif stresin değerlendirildiği bir çalışmada artmış oksidatif stres ve polip gelişimi üzerine kurulan hayvan deney modelinde okside trigliseritin ve artmış oksidatif stresin polip formasyonu oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (20)

PON1'in, hücre zarı ve lipoproteinler üzerine serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı antioksi-

dan etki gösterdiği gösterilmiştir (21) Bu çalışmada PON1 ve İndüklenebilir PON1 aktivitesi polip hastalarında sağlıklı kontrollere göre düşük bulunmuştur. Bunun sebebi polip hastalarında serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonunun artması ve artan lipid peroksitlerin PON1'in serbest sülfidril gruplarına bağlanarak enzimin aktivitesini azaltması olabilir (22). Başka bir mekanizma enflamasyon sırasında salgılanan IL-1,IL-6, TNF- α gibi sitokinler tarafından PON1 aktivitesinin inhibe edilmesidir (23,24). Bazı gastrointestinal kanserlerde IL-1 ve TNF- α düzeylerinin yükseldiğini bildiren araştırmalar bu tezi desteklemektedir (25). Bir diğer mekanizma polipli hastalardaki enflamatuvar yanıtı bağlı olarak PON1 aktivitesinin düşmesidir. Akut faz yanıtı indüklenen ratlarda PON1 aktivitesi ve hepatik PON1 mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (26). Kolon poliplerinde henüz araştırılmamakla beraber PON1 aktivitesinin azalmasına neden olabilecek bir diğer mekanizma genetik bir defekt nedeniyle PON sentezinin baskılanması olabilir.

Bu çalışmada polip hastalarında arilesteraz aktivitesi sağlıklı kontrollerden yüksek bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. İnflamatuvar ve tümöral hastalıklarda PON1 ve Arilesteraz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar içermektedir. Bazı çalışmalarda PON1 aktivitesindeki düşüşe paralel olarak arilesteraz aktivitesinde de düşüş görülürken bazılarında da PON1 aktivitesindeki düşüşe rağmen arilesteraz aktivitesinde anlamlı bir değişime rastlanmadığı bildirilmiştir (27). Bu farklı sonuçların sebebi PON1 enzimi polimorfizm göstermesine rağmen, arilesteraz enzimi genetik polimorfizm göstermemesi ve arilesterazın PON1'deki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmesi olabilir (28,29).

Kolon polipli hastaların kolorektal kansere dönüşmesi ile ilgili olarak PON1 aktivitesinin ve azalan oksidatif defansın önemli olduğunu düşünmekteyiz. Zira kolon kanserinde yapılan çalışmalarda polip kanser dönüşümünde önemli rol oynayan displazi derecesinin genetik mutasyonlardan etkilenebileceği bildirilirken, PON1 aktivitesinin kolon kanserli hastalarda sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğu bulunmuştur (30,31).

Sonuç olarak adenomatöz kolon polipli hastalarda PON1 ve arilesteraz aktivitesinin ilk kez değerlendirildiği bu çalışmada serum PON1 aktivitesinin anlamlı olarak azalması, oksidatif stres artışına neden olarak adenomatöz kolon polibi patofizyolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Gelecekte kolon polipli hastalarda yapılacak PON polimorfizm çalışmaları bu konunun sağlıklı olarak aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Kaynaklar

1. Yamaner S. Colorectal polyps. Kolon Rektum Hast Derg 2007;17:1-

Tablo 1: Çalışmaya katılan hastaların demografik bulguları ve biyokimyasal test sonuçları

	Kontrol	Polip
Yaş (yıl)	57±12	60±9
Kilo (kg)	76,7±13,7	81,1±8,4
Boy (cm)	163,5±7,6	167,7±5,8
BMI	28,4±5,7	28,8±2,7
Glukoz (mg/dl)	103,0±20,8	99,4±18,4
Kolesterol (mg/dl)	206,3±53,6	199,9±37,4
Trigliserid (mg/dl)	146,3±47,5	126,3±54,2
HDL (mg/dl)	48,8±8,4	41,4±7,2
LDL (mg/dl)	132,9±39,9	138,9±30,7

Tablo 2: Çalışmaya katılan kontrol ve polip gruplarının PON, indüklenmiş PON ve arilesteraz sonuçları

	Median	Min - Max	Median	Min - Max
PON1 (U/L)	142,7	43 - 298	27,7	9 - 68
İndüklenmiş PON1 (U/L)	238,1	62 - 781	86,4	29 - 200
Arilesteraz (U/L)	79756	5973 - 190827	108590	31188 - 190315

2. Naini BV, Odze RD. Advanced precancerous lesions (APL) in the colonic mucosa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013;27:235-56.
3. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007;121:2381-6.
4. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006;391:499-510.
5. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994;91:133-40.
6. Diaz-Castro J, Alferes MJ, Lopez-Aliaga I, et al. Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition* 2008;24:1167-73.
7. Hori A, Mizoue T, Kasai H, et al. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci* 2010;101:517-22.
8. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.
9. Uysal S, Akyol S, Hasgöl R, Armutcu F, Yigitoglu MR. Çok yönlü bir enzim: paraoksonaz. *Yeni Tıp Derg* 2011;28:136-41.
10. La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999;119-120:379-88.
11. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W. Genetic Factors Influencing the Metabolism of Foreign Compounds: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Pergamon Press, New York 1992; 51-91.
12. Harel M, Brumshtein B, Megeed R, et al. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol* 2007;58:347-53.
13. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, et al. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
14. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, et al. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100-6.
15. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-38.
16. Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1.1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:391-5.
17. Hammoud SS, Cairns BR, Jones DA. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:177-83.
18. Sweetser S, Smyrk TC, Sugumar A. Serrated polyps: critical precursors to colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5:627-35.
19. Rainis T, Maor I, Lanir A, et al. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig Dis Sci* 2007;52:526-30.
20. Ikeda K, Mutoh M, Teraoka N, et al. Increase of oxidant-related triglycerides and phosphatidylcholines in serum and small intestinal mucosa during development of intestinal polyp formation in Min mice. *Cancer Sci* 2011;102:79-87.
21. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, et al. Copper-induced oxidative damage on astrocytes: protective effect exerted by human high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2003;1635:48-54.
22. Başkol M, Başkol G, Koçer D. Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri. *Türk Klinik Biyokim Derg* 2007;5:83-9.
23. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:435-47.
24. Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, et al. Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 2002;9:160-4.
25. Macri A, Versaci A, Loddo S, et al. Serum levels of interleukin 1beta, interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha as markers of gastric cancer. *Biomarkers* 2006;11:184-93.
26. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, et al. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307-15.
27. Kiss E, Seres I, Tarr T, et al. Reduced paraoxonase I activity is a risk for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1108:83-91.
28. Türkoğlu S, Gülcü Bulmuş F, Parmaksız A, ve ark. Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri. *Fırat Tıp Derg* 2008;13:110-5.
29. Gursu MF, Ozdin M. Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Derg* 2002;7:732-7.
30. Balci H, Genc H, Papila C, et al. Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* 2012;26:155-60.
31. Bulbuller N, Eren E, Ellidag HY, et al. Diagnostic value of thiols, paraoxonase 1, arylesterase and oxidative balance in colorectal cancer in human. *Neoplasma* 2013;60:419-24.