

Deneysel Kolon Karsinogenezinde Disulfiram'ın İnhibitör Etkisi

THE INHIBITORY EFFECT OF DISULFIRAM ON EXPERIMENTAL COLON CARCINOGENESIS

Dr.Gürsel SOYBİR (*), Dr.Muhammed AKAN (*), Dr.Ayşenur AKYILDIZ İĞDEM (**),
Dr.Ali ÖZŞEKER (*), Dr.Feza EKİZ (*), Dr.Yalçın AKER (***)

S.B. Taksim Hastanesi, 1.Cerrahi Servisi (*), Patoloji Servisi (**), İSTANBUL
Celal Bayar Üniversitesi Cerrahi Ana Bilim Dalı (***), MANİSA

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada deneysel kolon karsinogenezi üzerine disulfiramın (DSF) kemoprevantif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Durum Değerlendirmesi: Kolon kanserinde kemoprevansiyon, giderek önemli bir tedavi alternatifi olmaktadır. Deneysel alanda bir çok ajan kemoprevantif özelliği nedeniyle araştırılmaktadır.

Yöntem: 30-35 gr ağırlığında 65 adet erkek CD-1 faresi üç gruba ayrılarak çalışılmıştır. Kolon kanseri indüksiyonu dimetilhidrazin (DMH) ile 13. haftaya kadar süren günlük subkütan enjeksiyonlarla yapılmıştır. DSF 25 mg/Kg/gün dozunda içme suyu ile ve DMH enjeksiyonlarından beş gün evvel verilmeye başlamış ve buna 31 hafta boyunca devam edilmiştir. 31. öldürülen farelerde, kolon ve diğer batin içi organlarda histopatolojik tetkik ile tümör varlığı araştırılmıştır.

Çıkarımlar: DSF verilen grupta, kolonda gelişen tümörlerin insidansı, multiplisitesi ve çaplarının, kemoprevansiyon yapılmayan gruba göre, anlamlı derecede daha düşük olduğu tesbit edilmiştir.

Sonuçlar: Oral verilen DSF'in deneysel kolon kanserinde, komplet karsinogenez üzerine inhibitör etki gösterdiği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kolon karsinogenezi, fare, disulfiram

SUMMARY

The chemopreventive effect of disulfiram (DSF) on experimental colon carcinogenesis has been investigated in this study.

65 male CD-1 mice weighing 30-35 gr were separated into three groups. Colon carcinogenesis was induced by daily subcutaneous dimethylhydrazin (DMH) injections. DSF was given daily 25 mg/Kg doses in drinking water. DSF started five days before DMH injections and continued during the experiment. Mice were sacrificed at 31st week of the experiment and histopathologic analysis were made in colon and other intraabdominal organs.

There were significant differences in incidence, multiplicity and size of tumours between the groups. It has been understood that, DSF in drinking water, has an inhibitory effect on experimental complete colon carcinogenesis.

Keywords: Colon carcinogenesis, mouse, disulfiram

Kolon kanseri tedavisinde son yirmi yılda birçok yenilikler ve gelişmeler olmasına rağmen, tedavi başarısı büyük oranda değişmeden kalmıştır. Tedaviye giderek daha önemli bir alter-

natif olan kemoprevansiyon, kanser oluşumunu kimyasal bir ajan ile inhibe eden veya geri çeviren yaklaşımdır (1,2). Son yıllarda bilim dünyasında sentetik maddelerin karsinogeneziste

kemopreventif ajan olarak değerlendirilmesi ve geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Kolon kanserinde de, laboratuvar hayvanları üzerinde bir çok ajan kemopreventif özellikleri için denenmektedir (1,3). Bu ajanlar, fenolik antioksidanlar, selenyum tuzları, oltipraz, vitamin D₃, piroksikam, D,L- α difluoro-methyl-ornitine, kalsiyum inositol hexophosphate, retinoidler, saflaştırılmış vitaminler, besin katkı maddeleri, metabolik ürünler ve protez inhibitörlerini içermektedir (4,5,6,7,8,9).

DMH veya metabolitleri (azoksimetan, metilazoksimetan) laboratuvar hayvanlarına tekrarlayan şekilde verildiğinde tümörlere, özellikle de kolon tümörlerine yol açarlar. DMH ile indüklenen intestinal karsinogenezis insan modeli için benzer bir model olarak kabul edilmiştir (10). Deneysel kolon kanseri kolon karsinogenezisini etkileyen faktörleri incelemede çok kullanılan deneysel sistem haline gelmiştir (11).

Deney farelerinde diyetle verilen DSF ve bunun bileşiklerinin, DMH ile indüklenen kolon karsinogenezisini inhibe edilebileceğini gösteren önemli çalışmalar bildirilmektedir (12,13). DSF'in, DMH'nin metabolik aktivasyonunu birkaç basamakta inhibe ettiği söylenmekte ancak bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İnhibitör etkinin karsinogenezisin başlangıç safhasında olduğu kabul edilmektedir (14).

Bu çalışmada; farelerde; DMH ile indüklenen kolon kanserinde, içme suyu ile verilen DSF'in, komplet karsinogenezdeki koruyucu etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Charles Rivers (Almanya) Laboratuvarı'ndan getirilerek Taksim Hastanesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi'nde üretilen CD-1 tipi fareler kullanılmıştır. Deney başlangıcında 45 günlük, sağlıklı ve 30-35 gr ağırlığında olan 65 adet erkek fare, çalışma kapsamına alınmıştır. Fareler deney boyunca standart fare yemi ve çeşme suyu ile beslenerek her kafese beş fare gelecek şekilde gruplandırılmıştır (içme suyu ile DSF verilen farelerin her biri ayrı bir kafeste barındırılmıştır). Tüm fareler 22-24 °C derece ısı, iyi ventilasyon ve 12 saat ışık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı oda şartlarında bulundurulmuştur.

65 adet fare üç gruba ayrılmıştır. Birinci gruba DMH (25 fare), ikinci gruba (25 fare) DMH ile birlikte DSF uygulanırken kontrol grubuna (15 fare) hiç bir ajan verilmeden deney boyunca izlenmişlerdir.

DMH: (Sigma, Almanya). 20 mg /Kg/ hafta dozunda (250 μ l hacminde) uygulanmıştır. Birinci ve 2. gruba 13 hafta boyunca haftada tek doz enjeksiyon şeklinde verilmiştir. Enjeksiyonlar sırt derisinden subkütaneöz olarak yapılmıştır. DMH stok solusyonları İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde hazırlanarak -20 °C şartlarında saklanmıştır. Haftalık olarak enjeksiyon günlerinde yeterli miktar solusyon deney laboratuvarına getirilerek uygulanmıştır.

DSF: (Nobel İlaç, İstanbul). DMH + DSF grubundaki her bir fare ayrı ayrı kafeslerde barındırılarak günlük aldıkları içme suyu hesaplanmıştır. DSF maddesini farelerin içme suyu ile alabildikleri, çalışma evvelinde, çalışma harici farelerde denenerek gözlenmiştir. 25 mg/kg /gün dozunda DSF farelere içme suyuna karıştırılarak verilmiştir. DSF'li içme suları farelere ilk DMH enjeksiyonundan beş gün evvel başlanmış ve deney boyunca verilmiştir.

Tüm fareler deney boyunca haftada bir kez tartılarak veriler kaydedilmiştir. İlk DMH enjeksiyonundan sonra 31. haftada (son DMH enjeksiyonundan 18 hafta sonra) tüm hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Farelerin kolon, ileum ve jejunum, karaciğer, akciğer, dalak, kalp, böbrek ve kulak kanalları çıkarıldı. Tüm kolon, anüsten ileo-çekal valve kadar, antimezenterik kenar boyunca longitudinal olarak açıldı. Tüm kolon mukozası buzlu serum fizyolojik ile yıkandı ve gruplardan haberi olmayan patoloji uzmanı tarafından tümör oluşumu için tetkik edildi. Tesbit edilebilen tümörlerin boyutları kompas ile ölçüldü. En büyük ve en küçük tümör çaplarının ortalaması alınarak ortalama median çaplar hesaplandı ve kaydedildi. Farelerden çıkarılan tüm dokular %10'luk tamponlanmış formalin solusyonuna konularak patoloji laboratuvarına götürüldü. Parafin blokları yapılan dokulardan multipl kesitler hazırlandı. Kesitler Hematoksilin-eozin ile boyanarak, gruplardan haberi olmayan uzman tarafından mikroskopik değerlendirmeye alındı. Deney sonunda elde edilen sonuçlar bilgisayar SPSS 6.1 İstatistik Programına kaydedilerek gruplar arası farklılıklar Student's t, Mann Whitney U ve symbol 99 % "Symbol" % 10 2 testleri ile değerlendirildi.

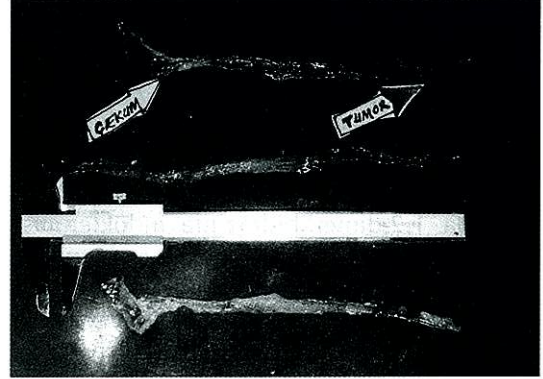
BULGULAR

Deneyin üçüncü haftasında sırt derisinde ileri derecede kalınlaşma ve enfeksiyon belirtileri görülen DMH grubundan üç, DMH + DSF grubundan iki fare, ayrıca, deneyin altıncı haftasında DMH grubundan görülen ileri derecede testis ödemi ve enfeksiyon belirtileri nedeniyle 2 fare çalışma dışı bırakılmıştır. Bunların sonucunda, DMH grubunda 20, DMH + DSF grubundan 23 fare değerlendirmeye alınmıştır.

Farelerin 31. hafta ağırlık değerlendirilmesinde, DMH+DSF ile kontrol grubu kıyaslandığında, anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak prevansiyon uygulanmayan DMH grubu hem kontrol grubuna ($p < 0.05$ $t = 2.18$), hem de DMH + DSF grubuna ($p < 0.01$ $t = 2.8$) göre vücut ağırlığı artımında geride kalarak anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 1). Kolonlardaki tümör oluşumu değerlendirildiğinde; DMH grubunda 17 farede (%85), DMH + DSF grubunda 11 farede (%47.7) tümör saptanmıştır (Resim 1). Tümör insidansı açısından iki grup arasındaki fark anlamlı ($p < 0.02$, $\chi^2 = 6.5$) bulunmuştur (Tablo 1).

Tümör multiplisitesi açısından yapılan değerlendirmede, DMH grubunda 2 farede 2'şer, 4 farede 3'er, 3 farede 4'er tümör saptanmıştır. DMH + DSF grubunda ise 3 farede 2'şer, 1 farede 3 tümör saptanmıştır. İstatistiksel değerlendirilmede DMH grubu multiplisite ortalaması (2.0 ± 1.5), DMH + DSF grubu ortalaması ise (0.7 ± 0.8) olarak bulunmuş grupların kıyaslanmasında ise fark istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$ $Z = 3.03$) bulunmuştur (Tablo 1).

Tümörlerin ortalama median çaplarının değerlendirmesinde; DMH (24.5 ± 5.0) ile DMH + DSF (18.4 ± 9.9) gruplarından elde edilen ortalama değerlerin kıyaslanmasında istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır ($p < 0.05$ $t = 2.42$) (Tablo 1).



Resim 1: DMH grubunda gelişen kolon tümörlerinden birinin makroskopik görünümü.

Tümörlerin histopatolojik değerlendirmesinde; kolonda tüm gruplarda görülen tümörler, (DMH grubundan 2 tanesi dışında) iyi diferansiye tubüler adenokarsinom olarak belirlenmiştir (Resim 2). DMH grubundan 2 tümörde ise ileri derecede displazi tesbit edilmiştir. Karaciğerde DMH grubunda görülen 2, DMH + DSF grubunda görülen 1 adet tümör metastatik olarak değerlendirilmiştir. Kolonda görülen tümörlerin lokalizasyonları ise Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 1. GRUPLARA GÖRE FARE VÜCUT AĞIRLIKLARI (31. HAFTA), TÜMÖR İNSİDANSI, MULTIPLİSİTESİ VE ÇAPLARI GÖRÜLMEKTEDİR.

Gruplar	Fare Sayısı	Vücut Ağırlığı #	Tümör İnsidansı(%)*	Tümör Multiplisitesi**	Tümör Çapı #
Grup1-DMH	20	34.1 ± 2.6	17(85)	2.0 ± 1.5	24.5 ± 5.0
Grup2-DMH + DSF	23	36.2 ± 2.4	11(47.7)	0.7 ± 0.8	18.4 ± 9.9
Grup3-Kontrol	15	35.2 ± 2.0	-	-	-
Anlamlılık		(G1-G3): $p < 0.05$ $t: 2.18$ (G1-G2): $p < 0.01$ $t: 2.8$ (G2-G3): $p > 0.5$ $t: 0.63$	$p < 0.02$ $\chi^2: 6.5$	$p < 0.01$ $Z: 3.03$	$p < 0.05$ $t: 2.42$

G: Grup # : Student's test **: Mann Whitney U test *: χ^2 test

**Tablo 2. TÜMÖRLERİN KOLONDAKİ
LOKALİZASYONLARI GÖRÜLMEKTEDİR.**

Grup	Tüm Kolon Yaygın	1/3 Orta ve Proksimal Kolon	1/3 Distal Kolon
DMH	1	3	13
DMH+DSF	1	1	2

TARTIŞMA

1,2-dimetilhidrazin ve bunun metabolitleri olan azoksümetan ve metilazoksümetanol, deney hayvanlarında kolonotropik karsinojenler olarak uzun zamandır kullanılmaktadır (11). Ratlarda 1,2-dimetilhidrazinle indüklenmiş tümörler histopatolojik, histokimyasal, ultrastrüktürel, sitokinetik ve antijenik açıdan insan intestinal tümörlerine büyük benzerlikler göstermektedirler. Bu sebeple, DMH, azoksümetan ve metilazoksümetanla indüklenmiş intestinal karsinogenezis, insan kolorektal kanser hastalığı açısından örnek olarak kabul edilmektedir. Ayrıca karsinogenezis olayının ve modifiye edici faktörlerin mekanizmasını inceleyen en yaygın deneysel modeli oluşturmaktadır (11).



Resim 2.: DMH verilen olgularda gelişen adenokarsinom odağı. (H+E X 40)

Çalışmamızda hayvanların ağırlık artışlarına baktığımızda, 31. haftada, DMH verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) kilo kaybı görülmektedir. Bu sonuç, karsinojen maddenin toksisitesine ve karsinogenezise bağlı oluşan beslenme ve gelişim geriliği olarak yorumlanabilir. DMH'ya ilaveten DSF verilen grupta anlamlı kilo kaybının olmayışı, DSF'in, karsinogenezin oluşturduğu olumsuz metabolik

etkiler ile beslenme ve gelişim geriliğinin oluşumunu engellediğine işaret edebilir.

Hem DSF, hem de bunun metaboliti karbondisülfidin, deney hayvanlarındaki, iyatrojen intestinal tümörlerin komplet prevansiyonunu gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Bu olayın; hem DSF hem de metaboliti karbondisülfitte ortak biokimyasal yapı olan thiono-sülfür bileşikleriyle sağlandığı düşünülmektedir. DSF, DMH ile DNA'nın alkilizasyonunu da önlediği bildirilmektedir (11,12,15). DMH verilen farelerde, kolon kanserinin prekürsör lezyonu olan aberrant kript odaklarının oluşumu da DSF ile tamamen inhibe edilebilmektedir (14,15,16). DMH ya da bunun metaboliti olan azoksümetan verilen hayvanlarda, kolon kanseri oluşumu, diyetle verilen DSF ile inhibe edilmektedir. Diyetle verilen DSF, azoksümetanla indüklenen tümörlerde %44 azalma yapmakta ve DMH ile indüklenen kolon kanserinde ise komplet inhibisyon oluşturmaktadır. Başka bir çalışmada benzer protokol kullanılarak, besinlerine DSF eklenen hayvanlarda, azoksümetanla indüklenen tümörlerde %60 azalma bildirilmiştir (15).

Bizim çalışmamızda; DMH ile % 85 oranında görülen tümör insidensi, DSF ile prevansiyon yapıldığında %48'e düşmektedir ($p < 0.02$). İnsidensin yanında tümör multiplisitesi ve tümör çaplarında da gruplar arasında bulunan anlamlı farklılık (Tablo 1), DSF'in kolon karsinogenezinde inhibitör etkinliğini açık şekilde pekiştirmektedir.

Tüm gruplarda, kolonlarda gelişen tümörlerin lokalizasyonları ağırlıklı şekilde distal kolonda bulunmaktadır. Bu sonuçlar, DMH'nın, mukozayla daha uzun süre temasta bulunduğu bölgelerde, karsinojenik etkisini daha fazla gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda DMH indüklenen deneysel kolon kanserinin DSF ile etkin şekilde kemoprevansiyonunun mümkün olduğu ortaya çıkmaktadır. Çalışma protokolumuz, karsinogenezisin tüm evrelerini kapsamaktadır. Dolayısıyla elde edilen inhibitör etkinin karsinogenezin sadece bir safhasına özgün olduğu bu çalışma ile söylenemez.

Deneyimizde DSF'in etki mekanizmasına ilişkin bir çalışma yoktur. Bu çalışmada DSF'in sadece etkinliği söylenebilir. Etki mekanizması için yeni ve detaylı çalışmalar gerekmektedir. Literatür incelendiğinde; DSF'nin DMH ve azoksümetanla indüklenmiş kolon kanserinde inhibitör etki mekanizmasının kesin olarak

bilinmediği görülmektedir. Ancak bunu sitokrom p450 aktivitesini düşürmek yoluyla, DMH ve azoksümetanın oksidasyonunu bloke ederek etkidiğini düşündürecek çalışmalar vardır (13,16,17). Bununla birlikte, bazı çalışmalar disülfiramın karsinojen detoksifikasyonunu, yardımcı enzim olarak bilinen glutatyon-S transferaz aktivitesini artırarak sağladığını bildirmektedir (18).

Sonuç olarak; Dimetilhidrazin ile indüklenen deneysel kolon kanserinde; Disülfiram, komplet karsinogenez üzerine kemoprevantif etki göstermektedir. Prevantif etkinin karsinogenezin hangi evrelerine ve hangi mekanizma ile etkidiğinin belirlenmesi yeni çalışmalar gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jagveer S, Gary K, Bandceru SR: Intermediate biomarkers of colon cancer: modulation of expression of ras oncogene by chemopreventive agents during azoxymetane induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14(4):699-704.
2. De Flora S, Zanacchi P, Izzotti A, Hayatsu H: Mechanisms of food-borne inhibitors of genotoxicity relevant to cancer prevention. In: Hayatsu H, eds. *Mutagens in food. Detection and Prevention*: Boca Raton: CRC Press, 1991:157-180.
3. Greenwald P, Nixon DW, Malone WF, Kelloff GJ, Stern HR, Wilkins KM: Concepts in cancer chemopreventive research. *Cancer* 1990; 65:1483-1490.
4. Sporn MB, Roberts AB: Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73:1381-1387.
5. Nallini K, Edith Z, Gary K: Effect of the chemopreventive agents piroxicam and D,L-difluoromethylornitine on intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13:995-1000.
6. Wattenberg LE: Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res* 1983; 43:2448S-2453S.
7. Pence BC, Buddingh F: Inhibition of dietary fat-promoted colon carcinogenesis in rats by supplemental calcium or vitamin D₃. *Carcinogenesis* 1988; 9:187-190.
8. Ullah A, Shamsuddin AM: Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F344 rats. *Carcinogenesis* 1990; 11:2219-2222.
9. Rao CV, Tokomo K, Kelloff G, Reddy BS: Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Carcinogenesis* 1991; 12:1051-1055.
10. Leon LG, Ebrahim A, Vickie K: Tumors produced in rats with a single dosage of 1,2-dimethylhydrazine. *Res Com Chem Pathol Pharm* 1993; 80(2):175-186.
11. Roumen B, Penka B, Zvetana M: Effect of metabolic inhibitors, methylxanthines, antioksidants, alkali metals, and corn oil on 1,2-dimethylhydrazine carcinogenicity in rats. *Anticancer Res* 1992; 12:933-940.
12. Wattenberg LW: Inhibition of dimethylhydrazine-induced neoplasia of the large intestine by disulfiram. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54:1005-1006.
13. Fiala ES: Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer* 1977; 40:2436-2445.
14. McLellan E, Birol RP: Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 1991; 12 (6):969-972.
15. Swenberg JA, Cooper HK, Buechler J, Kleihues P: 1,2-Dimethylhydrazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. *Cancer Res* 1979; 39:465-467.
16. Wattenberg LW, Fiala ES: Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasia of the large intestine in female CF mice by carbonium disulfide: brief communication. *J Natl Cancer Inst* 1978; 60:11-18.
17. Hunter AL, Neal RA: Inhibition of hepatic mixed-function oxidase activity in vitro and in vivo by various thiono-sulfur-containing compounds. *Biochem Pharmacol* 1975;
18. Talalay P: Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 1989; 28:237-250.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr.Gürsel SOYBİR

Kaptanpaşa Mah. Ziya Türkan Cad.

Özümit B Blok D:56 80250

Okmeydanı İSTANBUL