

Rat Kolonunda Azoksümetanla Oluşturulan Kimyasal Karsinogeneze Haloperidolün Etkisi

THE EFFECT OF HALOPERIDOL TO CHEMICAL CARCINOGENESIS DEVELOPED BY AZOXYMETHANE IN RAT COLON

Dr. Ahmet KASAP, Dr. Özgül PAŞAOĞLU*, Dr. Serdar ERKASAP,
Dr. Ersin ATEŞ, Dr. Adnan ŞAHİN, Dr. Ertuğrul KARAHÜSEYİNOĞLU

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD, (*) Patoloji ABD, ESKİŞEHİR

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, Azoksümetanla oluşturulmuş deneysel karsinogeneze, bir dopamin antagonisti olan haloperidolün etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Durum Değerlendirmesi: Bu konuda daha önceden yapılmış olan çalışmaların doğruluğunu araştırmak amacıyla planlanmış ve ek parametreler kullanılmıştır.

Yöntem: Çalışmada 32 adet Spraque-Dawley türü sıçan kullanıldı. Kontrol grubuna; 7.4mg/kg. dozda azoksümetan, izotonik sodyum klorür çözeltisi içinde, 10 hafta süre ile haftada bir kez olmak üzere subkütan olarak uygulandı. Deney grubuna, kontrol grubundaki işleme ek olarak, 2mg/kg dozda haloperidol, izotonik sodyum klorür çözeltisi içinde, gün aşırı olarak, 30 hafta süresince uygulandı.

Çıkarımlar: Azoksümetanla kimyasal kolonik karsinogeneze olduğu gözlemlendi ve haloperidolün kimyasal karsinogeneze histolojik olarak tam önlemediği, ratlarda kalori alımını azaltarak kilo azlığına sebep olduğunu saptadık. Kilo ile karsinom oluşan ratların sayısı arasında pozitif yönde bir ilişki olduğunu belirledik. Lipid bağımlı siyalik asit seviyelerinin neoplastik olgularda anlamlı derecede yükseldiğini ve bu parametrenin malign vakaların tanısında ve izlenmesinde önemli rol oynadığını belirledik.

Sonuç: Azoksümetanla oluşturulan karsinogeneze, dopamin antagonisti olan haloperidolün tümör oluşumunu istatistiksel olarak azaltmadığını, ancak tümör markırlarında olumlu etkisinin olduğunu tespit ettik.

Anahtar kelimeler: Haloperidol, karsinogeneze, azoksümetan, dopamin antagonisti

SUMMARY

This experiment is managed in order to detect the effect of haloperidol – a dopamin antagonist – to experimental carcinogenesis developed by azoxymethane. It is planned to confirm the previous examination results and because of this additional parameters were used. 32 Spraque-Dawley rats were included in this examination. 7.4 mg/kg azoxymethane in isotonic NaCl was injected subcutaneously to control group once a week for 10 weeks. The experimental group, additional to control ones 2 mg/kg haloperidol in isotonic NaCl is injected once in two days for 30 weeks. It is observed that chemical carcinogenesis occurred with azoxymethane and haloperidol couldn't prevent chemical carcinogenesis completely, histologically and caused loss of weight by decreasing the caloric intake for rats. There was a positive correlation between weight and the number of rats which became carcinogenic. Lipid dependent sialic acid levels were high in neoplastic ones and concluded that this parameter was very useful to diagnose and survey the malign events. So we found that haloperidol – a dopamin antagonist – couldn't decrease the rate of azoxymethane

induced carcinogenesis but had a beneficial effect about the tumor marker levels. It is searched the effect of haloperidol to azoxymethane induced carcinogenesis in rats. While haloperidol decreased the tumor marker levels, it couldn't prevent the cancer occurrence histologically.

Keywords: Haloperidol, carcinogenesis, azoxymethane, dopamin antagonist

Tümör, organizmadaki hücrelerden herhangi birinin az veya çok otonomi kazanarak çoğalması sonucunda oluşan ve neden ya da nedenler ortadan kalktıktan sonra da büyümesini sürdüren bir oluşumdur (1).

Kanser etyolojisini kısaca şu başlıklar altında toplayabiliriz.

Endojen karsinojen etkenler

Genetik ve kalıtsal faktörler

Hormonlar

Ekzojen karsinojen etkenler

Viral karsinojenler

Fiziksel karsinojenler

Kimyasal karsinojenler

Bunlar da direkt ve indirekt etkili karsinojenler olarak ikiye ayrılırlar. İndirekt etkili kimyasal karsinojenlerden azoksümetan, günümüzde daha iyi bilinen özellikleri ile deneysel olarak karaciğer, böbrek, kolon, dış kulak yolu, ince barsaklarda tümör oluşumunu başlatan bir karsinojendir. 1,2 dimetilhidrazinin metabolik yolunun açığa çıkarılması ile azoksümetanın onun bir ara ürünü olduğu ortaya çıkmıştır (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11).

Kimyasal karsinogenezisin önlenmesi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Dopamin agonisti olan bromokriptinin, gün aşırı uygulanmasının gastrik kanser sayı ve insidansında, gastrik antral mukoza sınırlama indeksinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (9). Bu bulgu, gastrik karsinogeneziste dopaminergic mekanizmaların rol aldığını düşündürmektedir (9).

Buradan hareketle yapılan deneysel çalışmalarda, insan kolon adenokarsinom hücre dizilerinde, dopamin reseptörleri bulunduğu gösterilmiş ve dopamin antagonistlerinin kimyasal karsinogenezisin önlenmesinde kullanılabileceği düşüncesi doğmuştur. Haloperidol de bu maddelerden birisidir ve butirofenon grubunda dopamin reseptör antagonistidir (9,12,13,14).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (TICAM) yapılmıştır.

Çalışmada 6 haftalık ortalama ağırlıkları

108.94 ± 1.08 gr arasında değişen 32 adet Sprague-Dawley türü ratlar kullanıldı. Tüm ratlar erkek cinsiyetinde seçildiler. Standart rat yemi ve su ile beslendiler.

Grup I (Kontrol) (n = 22): Azoksümetan (Sigma A 9517) 10 hafta süre ile her hafta ve haftanın ilk günü olmak üzere aynı saatlerde, 7.4 mg/kg dozda, izotonik sodyum klorür içerisinde subkütan olarak enjekte edildi.

Grup II (Deney grubu) (n = 10): Kontrol grubuna uygulanan prosedüre ek olarak, azoksümetan yapılmaya başlandığı günden itibaren, karsinogenezisin inhibisyonu amacıyla 30 hafta süre ile, gün aşırı, 2 mg/kg dozunda, izotonik sodyum klorür çözeltisi içerisinde, subkütan haloperidol uygulandı. Deneyin başında ve haftada bir kez olmak üzere ratların ağırlıkları kayıt edildi.

30 hafta sonunda tüm ratlar, eter anestezisi altında uyutularak, intrakardiyak 1 ml kan alındı. Median kesi ile karın ve göğüs boşlukları açılarak otopsileri yapıldı. Kalın barsak ileoçekal valvden anüse kadar diseke edilerek çıkartıldı. İnce barsakta lezyon bulunan segmentler ve kalın barsağın tümü karton plakalar üzerine yapıştırılarak, %10 luk formalin solüsyonuna konuldu. Tespit edilen kolon ve ince barsak spesmenlerinin makroskopik resimleri çekildikten sonra, kalın barsak ileoçekal valvden itibaren anüse kadar en az 5 ve en fazla 7 segmente ayrıldı. Segmentlerin tamamı en az 2 ve en fazla 4 dilim halinde takibe alındı.

Barsaklardan 5-6 mikron kalınlığında hazırlanan kesitler Hematoksilin-Eozin boyası ile boyandı. Gerek duyulduğunda Mucicarmine ve PAS boyaları ile alfa ve kappa için immünohistokimyasal boyama yöntemleri uygulandı.

Kolonlarda ve ince barsaklarda izlenen fokal kronik inflamasyon ve mukozal lenfoid hiperplazi yok (-), hafif (+), orta (++) olmak üzere üç derecede değerlendirildi. Regional lenf nodlarında ya da mukozal lenfoid dokuda gözlenen globüler materyal fagosite etmiş histiyositler var (v), yok (y) olarak ifade edildi. Beş ve daha az sayıda glanddan oluşan adenomatöz değişiklikler mikroadenom (aberran kript) olarak nitelendirildi. Beşten fazla gland içerenler adenom kapsamına alınarak her deney hayvanındaki toplam sayıları

belirtili. Aberran kript ve adenomlardaki displazi dereceleri düşük ve yüksek olmak üzere iki derece üzerinden belirlendi. Tüm deney hayvanlarında kalın barsak ve ince barsaklarda gözlenen karsinom türleri, diferansiyasyon dereceleri ve invazyon derinlikleri saptandı. Mitotik indeks; proksimal ve distal kolonlarda ayrı ayrı olmak üzere, lümenle dik açı ile açılan kriptler baz alınarak 30 kriptteki mitoz adeti sayılarak belirlendi. Rejional lenf nodlarının histolojik görünümüleri belirtildi. Mikroskopik inceleme sırasında dikkat çekici bir bulgu olarak saptanan, globüler mater-yal fagosite etmiş histiyositlerin gözlendikleri lokalizasyonlar belirtildi.

Alınan kan örneklerinden, CEA, CA 19-9, total siyalik asit ve lipid bağlı siyalik asit ölçümleri yapıldı. CEA, CA 19-9 değerleri, kitleri kullanılarak, Eliza yöntemi ile çalışıldı. Total siyalik asit ölçümü yapmak için resorsinol ayırıcı kullanıldı. NANA (N-Asetil nöraminik asit, SİGMA) ile standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Resorsinol ile çalışılan örneklerin absorban değerleri, 580nm'de köre karşı okunarak standart kalibrasyon grafiğinden değerlendirildi. Lipid bağlı siyalik asit ölçümü için Nonda Katopodis ve C. Chester Stock tarafından kullanılan yöntem kullanıldı.

Bulunan sonuçlar, Fisher ki-kare iki yönlü testi, t-testi, Mann-Whitney U testi ve Sperman Korelasyon testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

BULGULAR

Kontrol grubundan 12 ve deney grubundan 8 deney hayvanından alınan kan örneklerinde tümör belirleyici olarak CEA, CA 19-9, total siyalik asit, lipid bağlı siyalik asit seviyeleri ölçü ve testi ile karşılaştırılmaları yapıldı (Tablo 1, 2).

Her iki grupta, aberran kript görülen denek sayısı ve toplam kript adeti Mann-Whitney u testi

TABLO 1: SERUM CEA VE CA 19-9 ORTALAMALARI VE İSTATİSTİKSEL KARŞILAŞTIRMASI

GRUPLAR	CEA(ng/ml) Ort. ± S.hata	CA 19-9(u/ml) Ort. ± S.hata
Kontrol(n = 12)	0.2 ± 0.0	2.5 ± 0.0
Deney(n = 8)	0.2 ± 0.0	2.5 ± 0.0
	p > 0.05	p > 0.05

TABLO 2: SERUM TOTAL VE LİPİD BAĞLI SİYALİK ASİT ORTALAMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI

GRUPLAR	T.Siyalik asit(mg/dl) Ort. ± S.hata	Lipid Bağlı Siy.A.(mg/dl) Ort. ± S.hata
Kontrol(n = 12)	74.21 ± 3.28	9.15 ± 1.83
Deney(n = 8)	65.53 ± 4.80	3.92 ± 0.94
P değeri	> 0.05 (t = 1.55)	< 0.05* (t = -2.18)

ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmış, önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (u = 65, p > 0,05). Her iki grupta da adenom görülen denek sayısı ve toplam adenom adedi açısından yapılan istatistiksel analizlerde (Mann-Whitney u testi ile u = 3, P > 0,05) belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Her iki grupta karsinom görülen denek sayısı ve toplam karsinom adedi, karşılaştırılmış (u = 27, P > 0,05) önemli bir farklılık tesbit edilmemiştir (Tablo 3).

Her iki grupta fokal kronik inflamasyonun dereceleri açısından yapılan istatistiksel analizlerde (Fisher ki-kare iki yönlü testi = 0.7026, P > 0.05) fark gözlenmemiştir. Her iki grupta, kolonlarda izlenen mukozal lenfoid hiperplazinin dereceleri açısından yapılan istatistiksel analizlerde (Fisher ki-kare iki yönlü testi = 0.2069, P > 0.05) anlamlı bir fark görülmemiştir. Her iki grupta regional lenf nodlarındaki metastaz açısından istatistiksel karşılaştırmada (Fisher ki-kare iki yönlü testi = 0.5342, P > 0.05) anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 4).

Her iki grupta globüler materyal fagosite etmiş histiyositlerin varlığı ve lokalizasyonları açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmada (Fisher ki-kare iki yönlü testi = 1.00, P > 0.05) fark saptanmamıştır. Mitotik indeks açısından gruplar arasında t-testi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmada; proksimal kolon için (t = -1.04, P > 0.05), distal kolon için (t = 0.40, P > 0.05) anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 5).

Her iki grubun deney sonunda alınan kilolarının ortalamalarında (t = 7.91, P < 0.001 *) önemli derecede farklılık saptandı.

Her iki gruptaki deney hayvanlarının bitiş kiloları ile karsinom oluşması arasındaki ilişki Spearman'ın korelasyon testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kanseri oluşumu ile kilolar arasında pozitif bir ilişki olduğu görüldü (r = 0,37, P < 0,05).

TABLO 3: KONTROL VE DENEY GRUPLARINDA KOLON TÜMÖRLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

GRUP	Toplam Denek Sayısı	ABERRAN KRİPT			ADENOM			KARSİNOM		
		Denek Sayı ve Yüzdesi	Toplam Lezyon Sayısı	Medyan Değer.	Denek Sayı ve Yüzdesi	Toplam Lezyon Sayısı	Medyan Değer.	Denek Sayı ve Yüzdesi	Toplam Lezyon Sayısı	Medyan Değer.
Kontrol	22	20 (%90.90)	40	1	3 (%13.63)	4	0	17 (%77.27)	21	1
Deney	10	8 (%80)	11	1	3 (%30)	3	0	5 (%50)	8	0.5

TARTIŞMA

Deneysel karsinogenezisi önlemek için çeşitli merkezlerde bir çok ilaç ve kimyasal ajanlar denemektedir. Kolon karsinogenezisinde dopaminin de etkili olduğu belirtilmektedir. Buna dayanılarak dopamin antagonistlerinin kimyasal karsinogenezisin önlenmesinde kullanılabileceği düşüncesi doğmuştur. Dopamin reseptörleri üzerinde antagonist etkileri olan haloperidol, 1950'li yıllarda keşfedilen ve nöroleptik ilaçlar arasında yer alan farmakolojik bir ajandır ve özellikle şizofreni tedavisinde kullanılmaktadır (9,12,13,14).

Haloperidol'un kimyasal karsinogenezisi hangi mekanizmalarla önlediği henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Bunlardan birincisi, kolonik karsinogeneziste total kalori alımının, karsinogenezisin önemli bir belirleyicisi olduğudur. Yapılan çalışmalarda, haloperidol verilen ratlarda, kilonun belirgin olarak düşük kaldığı saptanmıştır (9). Bu çalışmada da, karsinom gelişen ratların sayısı ile kilo alımı, istatistiksel olarak karşılaştırıl-

dığında pozitif yönde anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Haloperidolün etki mekanizmasındaki ikinci teori ise, hücre içi cAMP seviyesindeki değişikliklerdir. Dopaminin hücrelerde cAMP üretimini artırdığı ve dopamin 1 reseptör antagonistlerinin bu etkiyi azalttığı gösterilmiştir. cAMP'nin de çeşitli hücre tiplerinin farklılaşma ve büyümesinde önemli rolü olduğu bilinmektedir (9).

Üçüncü bir etki mekanizması ise; haloperidol tedavisinin, asetilkolinesteraz aktivitesini azalttığı ve hücre bölünmesini etkilediği yönündedir (9,15).

Lishi ve arkadaşları, azoksimetanla oluşturulmuş kolonik karsinogenezisin inhibisyonu amacı ile haloperidol verdikleri ratlarda adenoma ve adenokarsinoma oluşumunun, kontrol grubundan anlamlı derecede az olduğunu göstermişler ve haloperidolün karsinogenezisi önlediğini ileri sürmüşlerdir (9).

Bizim çalışmamızda ise; karsinom gelişen ratlar, deney grubunda sayı ve yüzde olarak az olmasına rağmen istatistiksel karşılaştırmada anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Aynı

TABLO 4 : KONTROL VE DENEY GRUPLARINDA GÖZLENEN HISTOPATOLOJİK BULGULAR VE REJİONAL LENF NODLARININ YAPILARININ KARŞILAŞTIRILMASI

GRUP	TOPLAM DENEK	Fokal Kronik İnflamasyon derecesi ve yüzdesi		Mukozal Lenfoid Hiperplazi derecesi ve yüzdesi	
		HAFİF (+)	ORTA (++)	HAFİF (+)	ORTA (++)
Kontrol	22	15 (%68.18)	7 (%31.81)	1 (%4.76)	20 (%95.23)
Deney	10	6 (%60)	4 (%40)	2 (%22.22)	7 (%77.77)

TABLO 5: KONTROL VE DENEY GRUPLARINDA GÖZLENEN HISTİYOZİT LOKALİZASYONU VE MITOTİK İNDEKS YÜZDESİ

GRUP	Rejional lenf nodu yapısı ve yüzdesi			Histiyozit Lokalizasyonu ve yüzdesi			Mitotik İndeks Yüzdesi
	Toplam Denek	Reaktif	Metastatik	Lenf nodu	Mukozal Lenfodi D.	Proksimal kolon	
Kontrol	22	19 (%86.36)	3 (%13.63)	15 (%88.23)	2 (%11.76)	0.5818 +0.066	0.9682 +0.134
Deney	10	10 (%100)	0 (%0)	1 (%85.71)	1 (%14.28)	0.7 +0.087	0.8833 +0.013

şekilde; aberran kript, mukozal lenfoid hiperplazi, mitotik indeks ve lenf nodu metastazı incelemelerinde iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Klinik ve deneysel çalışmalarda, CEA ve CA 19-9, kolorektal karsinomlarda tümör belirleyici olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kaynaklarda kolorektal karsinomlarda duyarlılığının % 97'ye ulaştığı, ancak erken kolon karsinomu tanısında sensitivitesi ve spesifitesinin düşük olduğu bildirilmektedir (16,17).

Bu deneysel çalışmada, tümör belirleyici olarak CEA, CA 19-9 ve total siyalik asit seviyeleri incelendiğinde, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir. Lipid bağlı siyalik asit düzeylerinde ise her iki grubun yapılan istatistiksel karşılaştırmasında anlamlı farklılık tesbit edilmiştir.

Sonuç olarak; rat kolonunda azoksümetanla oluşan kimyasal karsinogeneze, dopamin reseptör antagonisti olan haloperidolün etkisi araştırıldı. Yapılan histopatolojik incelemede haloperidol tümör oluşumunu sayısal olarak azaltmakla birlikte, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel farklılık saptanmadı. Yine aynı CEA, CA 19-9, total siyalik asit seviyeleri açısından da benzer sonuçlar alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Yenerman M. Genel Patoloji. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 3th edition; 1994:2:960-975, 1362-1401.
2. Pozhariaski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, Shaposhnikov JD. Experimental intestinal cancer research with special reference of human pathology. Adv. in Cancer Research 1979;30:165-237.
3. Singh J, Kelloff C, Reddy BS. Intermediate biomarkers of colon cancer: modulation of expression of ras oncogene by chemopreventive agents during azoxymethane induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis 1993; 14 (4):699-704
4. Hamilton SR, Sohn OS, Fiala ES. Inhibition by dietary ethanol of experimental colonic carcinogenesis induced by high-dose azoxymethane. Cancer Research 1988;48:3313-3318.
5. Reddy BS, Tokuma K, Kulkarni N, Aligina C, Kelloff C. Inhibition of colon carcinogenesis by prostoglandin synthesis inhibitors and related compounds. Carcinogenesis 1992; 13:1019-1023.
6. Rao CV, Tokuma K, Rigotty J, Zang E, Kelloff C, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam alfa difluoromethylornitine, 16 alfa fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination. Cancer Research 1991; 51:4528-4534.
7. Zang SZ, Luk GD, Hamilton SR. Alfa difluoromethylornitine induced inhibition of growth of auto chthonous experimental colonic tumors produced by azoxymethane in male F344 rats. Cancer Research 1988; 48: 6498-6503.
8. Lijinsky W, Saavedra JE, Reuber M D. Organspecific carcinogenesis in rats by methyl-ethylazoxyalkanes. Cancer Research 1985; 45:76-79.
9. Lishi H, Baba M, Tatsuta M, Okuda S, Taniguchi H. Inhibition by the dopamine antagonist haloperidol of experimental carcinogenesis induced by azoxymethane in rat colon. Cancer Research 1991; 51:6150-6152.
10. Flick JA, Hamilton SR, Rosales FJ, Perman JA. Methane excretion and experimental colonic carcinogenesis. Dig. Dis. and Sci. 1990; 35: 221-224.
11. Sohn OS, Fiala ES, Puz C, Hamilton SR, Williams GM. Enhancement of rat liver microsomal metabolism of azoxymethane to methylazoxy metha-

- nol by chronic ethanol administration: Similarity to the microsomal metabolism of N-Nitrosodimethylamine. Cancer Research 1987;47:3123-3129.*
12. Tuğlular I. Nöroleptikler. In: Farmakoloji Dökmeci İ. Nobel Tıp Kitabevleri. 1992; 352-359.
 13. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Ulucan Matbaası Ankara 3. Baskı 1985; 2: 1779-1807.
 14. Glavin GB, Szabo S. Dopamine in gastrointestinal disease. Dig. Dis. and Sci. 1990; 35:1153-1161.
 15. Tatsuta M, Lishi H, Baba M, Taniguchi H. Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Wistar rats fed a low-protein diet. Int. J. Cancer 1992; 50 : 108- 111.
 16. Kocaoğlu H, Ünal AE. Kolorektal Kanseler. In : Klinik Cerrahi Onkoloji. Ünal A. Özkan Matbaacılık Ankara 1. Baskı; 1997:496-513.
 17. Erbil KM, Jones J, Klee GC. Use and limitations of serum total and lipid-bound sialic acid concentrations a marker for colorectal cancer. Cancer 1985; 55:404-409.
-

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr. Serdar ERKASAP
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel
Cerrahi ABD ESKİŞEHİR