

Kolon Kanseri Hastalarının Dışkı Safra Asit Düzeyleri

Engin BOZKURT*
Yavuz TAGA**
Faruk MEMİK***

ÖZET

Kolon kanseri etyolojisinde safra asitlerinin oynadığı rolü daha iyi anlayabilmek amacı ile yapılan araştırmada, 14 kolon kanserli olgu ve 13 gastro-intestinal sistem dışı rahatsızlığı olan olgu çalışıldı. Dışkıda total safra asitleri sülfürik asit yöntemi ile, 7-OH steroid safra asitleri ise enzimatik olarak tayin edildi. Ayrıca safra asitleri dağılımları ince tabaka kromatografisi yöntemiyle kalitatif olarak incelendi.

SUMMARY

Investigation of The Role of Faecal Bile Acids in Colon Cancer Etiology

14 cases of colon carcinoma and 13 cases who were hospitalized because of non gastro-intestinal causes were included in this study. Total bile acids in the faeces were determined by the sulfuric acid method, 7-OH steroid bile acids were determined enzymatically. Bile acids were also examined qualitatively by thin layer chromatography.

* Uzm.Dr.; Uludağ Univ. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

** Yard.Doç.Dr.; Uludağ Univ. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Biyokimya Doktoru, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı.

*** Prof.Dr.; Uludağ Univ. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

Epidemiyolojik çalışmalar kolon kanseri sıklığının coğrafi bölgelere ve sosyo-ekonomik duruma göre değiştiğini göstermektedir¹⁻⁸. Ayrıca bir toplumda kültürel alışkanlıklara bağlı olarak bu hastalığa yakalanma oranları değişmektedir. Örneğin prevalansın düşük olduğu Japonya'dan Amerika'ya göç eden Japonlarda kolo-rektal kanser sıklığı artmaktadır¹⁻⁶. Bugünkü bilgilere göre hastalığın oluşumunda çevresel etmenlerden çok, kültürel alışkanlıklar ön planda olup, fiziksel ve genetik etmenler daha az önem taşımaktadır².

Kalın barsak kanserinin oluşumunda lumen içeriğinin, özellikle mikrofloranın safra asitlerinin ve kolesterol metabolitlerinin rol oynayabileceği düşünülmektedir⁷⁻⁹. Yüksek kanser riskli bölgelerde ve yüksek yağ diyeti uygulanarak yapılan deneysel çalışmalarda, safra asitlerinin ve metabolitlerinin dışkıdaki konsantrasyonları yüksek bulunmuştur^{4,7,10}.

Kolon kanseri riski yüksek ve düşük toplumlarda dışkı safra asit konsantrasyonları çalışılmış, bazı çalışmalarda riski yüksek toplumlarda safra asitleri yüksek bulunurken, bazı çalışmalarda da arada bir fark saptanamamıştır^{2,7,10,11}.

Diğer yandan intrarektal n-metil, n-nitro, n-nitrosoguanidin (MNNG) verilerek tümör oluşturulan sıçanlara intrarektal litokolik asit verildiğinde tümör sayı ve büyüklüğünde artma görülmüştür^{4,12}. Bir diğer deneysel çalışmada n-metil, n-nitrosoure verilerek oluşturulan tümörlerin, sayı ve hacminde kolik asit verildiğinde artma görülmüştür¹³.

Toplumsal çalışmalar ve kontrollü hayvan deneyleri, kolon kanser oluşumunda diyet, safra asitleri ve kolesterol metabolitlerinin etkili olabileceğini düşündürmektedir^{2-7,10,14,15}. Bu çalışmada, kolon kanseri tanısı konulmuş olan hastalarda, dışkı safra asitleri düzeyinin kontrollara göre bir farklılık gösterip göstermediğini saptamak amacını güttük.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kolo-rektal kanser kesin tanısı almış 14 hasta çalışmamıza katıldı. Hastalarımızın 9'u erkek (yaş ortalaması: 57.5 ± 17.03) ve 5 tanesi de kadını (yaş ortalaması: 46 ± 7.58). Gastro-intestinal bir hastalığı olmayan 13 kontrolün 8'i erkek (yaş ortalaması: 53 ± 0.8) ve 5'i kadını (yaş ortalaması: 46 ± 5.48).

Tüm hasta ve kontrollerin, toplanan dışkıları polietilen kaplara alınıp 15 dakika içinde -20°C 'daki dondurucuya alındı ve çalışma zamanına kadar bekletildi. Dışkıların tümü preoperatif olarak, baryumlu radyolojik tetkiklerden en az 15 gün sonra alındı ve bu sürede hasta ve kontroller antibiyotik ve antiasit kullanmadılar.

Çalışmak için, oda sıcaklığına getirilen dışkılar metanol içinde homojenize edildiler. Homojenat'daki lif kısmı santrifüje ayrılarak, süpernatantlar "dry freezer" de kurutuldu ve numuneler 500 mg kuru dışkı ağırlığı olacak şekilde ayrıldılar. Kurulu dışkı numuneleri 5 ml etanol/dieter (3/1 oranda v/v) karışımında çözüldüler. Bu çözeltilere 20'er ml % 90 etanol içinde 1M NaOH çözeltisi katıldı. Numuneler 1 saat geri soğutucuda ısıtıldılar. Daha sonra 3'er kez 25'er ml petrol eteri ile yıkanan numuneler son olarak da 2'er kez heptan ile yıkandılar ve dikkatlice buharlaştırılıp herbiri 5 ml hacimde toplandı.

Total Safra Asitleri Tayini:

Numune çözeltilerinden 50 mikrolitre bir deney tübüne konuldu. Üzerine 3 ml 650 gm/kg sülfürik asit eklendi. Karışımlar 1 saat süre ile 60°C'daki sıcak su banyosunda bekletildiler. 20 dakika 1500xg'de santrifüj edilip 386 nm'de köre karşı okundular. Standart analiz eğrileri tek tek, saf deoksikolik asit, litokolik asit, kenodeoksikolik asit kullanılarak ve bunların değişik oranlardaki karışımları kullanılarak incelendi. Sonuçta, total safra asitleri tayininde standart analiz eğrisi çizerken 10 birim deoksikolik asit, 1 birim kolik asit ve bir birim kenodeoksikolik asit karışımı standart olarak kabul edildi.

Enzimatik Olarak Safra Asit Tayini:

Enzimatik tayinlerde 7-alfa-hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi (Sigma Chemical Co. Product No: H-9506) kullanıldı. Bu enzim ile hazırladığımız dışkı-safra asit çözeltilerindeki kolik asit, kenodeoksikolik asit ve bunların glisin ve taurin türevleri incelendi.

Belirtilen enzimin 1 ünitesi, beta-NAD'nin varlığında, 25°C'da pH: 8.9'da, bir dakika süresince bir mikromol kenodeoksikolik asiti okside etmekteydi.

İnce Tabaka Kromatografisi:

20 gm 'silica gel' 1mM Na₂CO₃ içinde 45 ml oluncaya kadar karıştırıldı. 'Camag' ince tabaka kromatografisi aparatı kullanılarak 0.5 mm kalınlığında jeller döküldü. Jeller oda sıcaklığında 1-2 saat kurutuldu. Deneyden önce 110°C da 1 saat aktive edildi. Standartlar ve numuneler 10 mikrolitrelik bir hacim içinde ve standartlar bu hacim içinde 40 mikrogram olarak konuldular. Daha sonra gene 'Camag' firmasından sağlanan 'sandwich chamber' kullanılarak kromatografi yapıldı. Taşıyıcı olarak iki ayrı karışım kullanıldı. Önce 10 birim n-butil alkol, 1 birim glasiel asetik asit 1 birim distile sudan oluşan bir karışıma batırıldı ve 20 dakika beklendi. Sonra 5 birim toluen 5 birim glasiel asetik asit ve bir birim distile sudan oluşan bir karışıma batırıldı ve 45 dakika beklendi. 5 dakika 110°C'da kurutulan plaklara atomizör ile 2 birim fosfomolibdat 20 birim glasiel asetik asit ve 1 birim konsantre sülfürik asit'den oluşan renklendirici püskürtüldü. Plak 20 dakika daha 110°C'da ısıtıldı. Kapalı bir kaptaki 20 dakika kadar da iyot buharına tutulup bekletilmeden resimleri çekildi.

Ortalama değerler \bar{x} standart hata (SH) olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirmede öğrenci t testi kullanıldı.

BULGULAR

Olgularımızın yaşlara göre dağılımları incelendiği zaman, dokuz erkek hastamızın yaş ortalamasının 57,55 \pm 17,03, 5 kadın hastamızın ise yaş ortalamasının 46,0 \pm 7,58 olduğu görüldü. 13 hastamızın cinsler arasındaki dağılımı 60 yaşına kadar belirgin bir fark göstermezken bu yaştan sonra erkekler aleyhine belirgin bir ağırlık kazanmakta idi.

Hastalarımızın kontrol grubu ile rutin hematolojik tetkikler yönünden (Hb, Hct, Lök. ve Sedimentasyon) karşılaştırdığımız zaman aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir fark saptamadık.

Hastalar rutin biyokimyasal tetkikler yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman ise, hasta grubun total lipit ortalaması % 536.87 \pm 22,62 mg, kontrol grubunun ise % 630.45 \pm 31.14 mg idi ve aradaki fark anlamlı idi ($p < 0.01$). Bunun dışında rutin biyokimyasal parametreler yönünden bir farka rastlanmadı.

Dışkı ekstrelerimizde total safra asitlerini tayin etmek için Ganshirt ve ark'nın önerdiği⁶ sülfürik asit yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile kolik asit, kenodeoksikolik asit, litokolik ve deoksikolik asitleri tek tek ve bir arada inceledik. Litokolik asit sülfürik asit ile karşılaşır karşılaşmaz bulanık bir çökelti oluşturuyordu. diğerlerinin 386 nm'da absorpsiyonları incelenip kalibrasyon eğrileri çizildiğinde kolik asitin şiddetli bir absorpsiyon gösterdiği, deoksikolik asitin oldukça az, kenodeoksikolik asitin ise hemen hemen hiç absorpsiyon göstermediği ayrıca deoksikolik asitin, kolik asitin oluşturduğu absorpsiyonu bir miktar azalttığı saptandı. Sonuçta dışkıdaki safra asitleri oranları gözönüne alındı ve normalde deoksikolik asitin kolik asite göre en az on misli fazla oluşundan hareketle kalibrasyon eğrisinde 10 birim deoksikolik asit 1 birim kolik asit ve 1 birim kenodeoksikolik karışımı standart olarak kullanıldı. Bu kalibrasyon eğrisi üzerinden kontrol ve hasta gruplarımızın dışkı ekstrelerindeki total safra asitlerini hesapladığımız zaman kontrol grubunda 28,52 \pm 2,87 $\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı ve hasta grubunda 25,94 \pm 2,99 $\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı sonuçlarını elde ettik (Tablo I).

Tablo : I
Dışkıda Total Safra Asitleri Değerleri

	X \pm SH		
	$\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı	n	p
Kontrollar	28,52 \pm 2,87	13	A.D.
Hastalar	25,94 \pm 2,99	14	A.D.

A.D.: Anlamlı değil

Dışkı ekstrelerimizde 7-OH steroid dehidrogenaz enzimi kullanarak 7-OH steroid safra asitlerini (kenodeoksikolik asit, kolik asit ve bunların glisin ve taurin türevleri) ölçtüğümüz zaman kontrol grubunda 11,20 \pm 0,71 $\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı, hasta grubunda ise 12,02 \pm 1,04 $\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı değerlerini elde ettik (Tablo II). Hasta grubunda kontrol grubuna göre gözlenen artış istatistiksel yönden anlamlı değildi.

Tablo : II
Dışkıda Enzimatik Olarak Saptanan 7-OH Safra Asitleri

	X \pm SH		
	$\mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı	n	p
Kontrollar	11,20 \pm 0,71	13	A.D.
Hastalar	12,02 \pm 1,04	14	A.D.

7-OH safra asitleri dışında kalan safra asitlerini indirekt olarak hesapladığımız zaman kontrol grubunda bunların $17.33 \pm 3.46 \mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı ve hasta grubunda $13.92 \pm 3.07 \mu\text{mol/gm}$ kuru dışkı olduğunu saptadık.

Olgularımızın dışkı safra asit dağılımları kalitatif olarak ince tabaka kromatografisi yöntemiyle incelendiğinde, hasta grubunun kolik asit ve kenodeoksikolik asitle eşdeğer bölgelerinde kontrollara göre relatif bir artış tespit edildi.

TARTIŞMA

Hill, Reddy, Wynder ve arkadaşlarının ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, kolon kanseri oluşumunun safra asitlerinin muhtemel bir etkisi olduğuna değinilmektedir^{2,4,5,7,9,15}.

Safra asitleri ile yapılan hayvan çalışmaları sonucunda, bunların ko-karsinogenik olarak etki edebileceği veya yıkım ürünlerinin karsinogene dönüşebileceği düşünülmektedir^{4,5,7,14}.

Bu hipotez doğrultusunda, kolon kanser oluşumu ile dışkı safra asitleri düzeyi arasında basit bir ilişki olup olmadığını incelemeyi amaçladık.

Hasta ve kontrollerimizin rutin biyokimyasal tetkikleri sırasında total lipiti hasta grubunda düşük bulduk. Literatürde kolon kanserli hastalarda serum kolesterol seviyesinin karaciğerde fazla safra asit yapımına bağlı olarak düşeceği bildirilmesine rağmen total lipitler hakkında böyle bir veriye rastlamadık. Çalışmamızda hasta kolesterol düzeyleri ise kontrollerden farklı değildi. Diyetle alınan yağın azalmasına bağlı olarak total lipitlerin düşebileceği düşünülse bile olgularımızın diyet yağ miktarlarını ayrıntılı ve kantitatif bir şekilde saptayamadığımız için bu yorum kanıtlanamamaktadır.

Total safra asitlerini ölçtüğümüz zaman hasta grubunda kontrol grubuna göre (istatistiksel yönden anlamlı olmamakla beraber) düşük değerler elde ettik. Değerlerimiz bu şekliyle, Moskovitz ve arkadaşlarının 1979 yılında yayınladıkları çalışmalarına benzerlik gösteriyordu¹⁸. Bu araştırmacılar 15 hasta ve 23 kontrol ile çalışmış ve hasta grubunda total safra asitleri ve nötral sterollerini düşük bulmuşlardır. Aynı benzerlik Murray ve ark.'nın çalışmalarında da görülmektedir¹⁹. Burada da 37 kolorektal kanser ve 36 kontrol üzerinde çalışılmış total safra asit konsantrasyonu hasta grubunda anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar kolorektal kanserlerde safra asit ve onun yıkım ürünlerinin arttığını yayınlayan Hill ve arkadaşlarının sonuçları^{2,4,5,7} ile çelişkilidir. Bu birbirine uyumsuz bulguların nedeni belli değildir. Safra ve kolesterolün karaciğerden salınımını değiştirebilen diyet faktörleri bu farklılıktan sorumlu olabilir. Reddy ve arkadaşları diyetteki fazla yağın, dışkı safra asitleri, bunların yıkım ürünlerini ve nötral sterollerini arttırdığını kontrollü çalışmalarla göstermişlerdir^{5,7,10}. Diyet değişimlerinin bu nedenlerle dışkı safra asit ve nötral sterol düzeylerini değiştirebileceği beklenebilir.

Sonuçlarımızın Hill ve ark.'nın sonuçlarına uyum göstermemesinin bir nedeni de, kanser belirtileri yeni olanlarla terminal dönemde olanları ayrı ayrı gruplamamızdan olabilir. Çünkü hastalığın ileri dönemlerinde kolon fonksiyonları bozulmaktadır. Özellikle konstipasyon önemli bir sorundur. Hatta operasyon öncesi günlerde bazen dışkı alınmamaktadır. Alınarlarda ise bazen dışkı özelliğini kaybet-

mekte kanlı sulu bir şekil almaktadır. Nitekim bizim hastalarımızdan 3 veya 4'ü kanlı, müküslü, sulu dışkı çıkarmaktaydı. Bir tanesi bir haftalık konstipe idi. Bir diğeri ise ileus nedeniyle başvurmuştu. 2 hastada da operasyondan hemen sonra kolostomi tüpünden dışkı alınmıştı. Benzer değişiklikler Moskowitz ve ark.'nın¹⁸ çalışmalarında da gözlenmiş ve araştırmacılar daha sonraki çalışmalarında konstipe hastaları çalışmadan çıkarmışlardır.

Yaygın parankimal karaciğer bozukluklarında (örneğin metastazlarda) safra ve nötral sterol atılımında yetersizlik olmaktadır¹⁸. Bu nedenle karaciğer metastazı olan durumlarda dışkı safra asit düzeyleri azalmış olabilir. Çalışmamızda kolon kanserli hastaların belirlenmemiş karaciğer metastazları olması mümkündür. 14 kişilik hasta grubumuzda operasyon sırasında 3 karaciğer metastazı tespit edilmiştir.

Dışkı ekstrelerimizden elde ettiğimiz 7-OH safra asit değerlerinde hasta grubunda anlamlı olmayan bir artma bulduk. İndirekt olarak hesapladığımız 7-OH steroidler dışındaki safra asitlerinde ise hasta grubunda gene anlamlı olmayan bir azalma gözleniyordu. Ayrıca hastaların dışkı safra asit dağılımları ince tabaka kromatografisi yöntemiyle kalitatif olarak incelendiğinde, kolik asit ve kenodeoksikolik asit'de kontrole göre bir artış gözledik. Bu bulgumuz 7-OH steroid dehidrogenaz kullanarak elde ettiğimiz verilere paralellik gösteriyordu. Bulgularımız Hill, Reddy, Wynder, Snigematsu^{2.4.5.7} gibi araştırmacıların bulgularına ters düşerken, Mudd, Moskowitz, Murray^{11.18.19} gibi araştırmacıların bulgularına uyum gösteriyordu.

Çalışmamız sonucunda kolon kanseri ile safra asit düzeyi arasında basit bir ilişki kuramadık. Bu konuda yapılacak çalışmalarda oldukça ayrıntılı olarak diyet incelemesi, kolon kanserli hastaların daha fazla sayıda ve hastalığın safhasına göre gruplandırılarak çalışmasının daha güvenli yorum yapılmasını sağlayacağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. BOCKUS, H.L.: Gastroenterology. Vol II. 3rd. ed. W.B. Saunders Co., London, Toronto, 1976, p. 1009-1044.
2. HILL, M.J.: Epidemiology and etiology of Colon Cancer. In: Colon Cancer, Vol. II, Fisher Verlag, Stuttgart, 1978, p. 15-27.
3. ELIAS, E.G.: Carcinoma of the colon and rectum. Part I/Epidemiology, Etiology and Diagnosis. MD State Med 1, March: 140-142, 1981.
4. HILL, M.J.: Bile acids in colorectal carcinogenesis. In Banbury Report 7: Gastrointestinal Cancer: Endogenous factors. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1981, p. 365-380.
5. REDDY, B.S., HEDGES, A.R., LAAKSO: K., WYNDER, E.L.: Metabolic epidemiology of large bowel cancer. Cancer, 42(6): 2832-2838, 1978.
6. TEPPÖ, L., SAXEN, E.: Epidemiology of colon cancer in Scandinavia, Israel J Med Sci, 15(4): 485-489, 1979.
7. REDDY, B.S.: Bile Salts and Other Constituents of the Colon as Tumor Promoters. In Banbury Report 7: Gastrointestinal Cancer: Endogenous Factors. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York, 1981, p. 345-363.

8. JENSEN, O.M., MC LENNAN, R.: Dietary factors and colorectal cancer in Scandinavia. *Israel J Med Sci*, Vol. 2: 479-483, 1979.
9. VARGO, D., MOSKOVITZ, M.H.: Faecal bacterial flora in cancer of the colon. *Ent. 21*: 701-705, 1980.
10. REDDY, B.S.: Diet and excretion of bile acids. *Cancer Res*, 41: 3766-68, 1981.
11. MUDD, D.G., MC KELVEY, S.T.D., NORWOOD, W., ELMORE, D.T., ROY, A.D.: Faecal bile acid concentrations of patients with carcinoma or increased risk of carcinoma in the large bowel. *Gut* 21: 587-590, 1980.
12. REDDY, B.S., WATANABE, K.: Effect of cholesterol metabolites and promoting effect of lithocholic acid in colon carcinogenesis in germ free and conventional F-344 rats. *Cancer Res*, 39: 1521-1524, 1979.
13. WATANABE, K., REDDY, B.S., WELSBURGER, J.H., KRITCHEVSKY, D.: Effect of dietary Alfalfa, Pectin and Wheat Bran on Azoxymethane or methylnitrosourea induced colon carcinogenesis in F-344 rats. *INCI*, 63(I): 141-145, 1979.
14. HILL, M.J., ARIES, V.C.: Faecal steroid composition and its relationship to cancer of the large bowel, *J Path* 104-109, 1971.
15. REDDY, B.S., WATANABE, K.: Effect of cholesterol metabolites and promoting effect of lithocholic acid in colon carcinogenesis in germ free and Conventional F-344 rats. *Cancer Res*, 39: 1521-24, 1979.
16. MAYER, D.: Bile Acids. In: *Clinical Biochemistry. Principles and Methods*. (ed. Curtis, H. Ch., Roth, M.) Walter de Gryter, New York, 1974, p. 885-907.
17. IV. Türk Gastroenteroloji Konferansı ve Paneller, Fatih Gençlik Vakfı Matbaa İşletmesi, 20-25 Eylül, İstanbul, 1981, p. 101-102.
18. MOSKOWITZ, M., WHITE, C., BORNET, R.N., STEVENS, S., RUSSELL, E., VARGO, D., GLOCH, M.H.: Diet, Fecal bile acids and neutral sterols in carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci*, 24(10): 336-344, 1979.
19. MURRAY, W.R., BLACKWOOD, A., TROTTER, J.M., CALMAN, K.C., MCKAY, C.: Faecal bile acids and Clostridia in the etiology of colorectal cancer *Br J Cancer*, 41: 929-936, 1980.

Uzm.Dr. Engin BOZKURT

U.Ü. Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

BURSA