

## Deneysel Araştırma

# Mide Kanseri Gelişiminde Duodenogastrik Reflünün Rolü: Siklooksijenaz-2 İnhibitörlerinin ve Balın Önleyici Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması\*

Sebahattin DESTEK<sup>1</sup>, Vahit Onur GÜL<sup>2,a</sup>, Yersu KAPRAN<sup>3</sup>, Emre BALIK<sup>4</sup>, Dursun BUĞRA<sup>4</sup>, Ali AKYÜZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Edremit Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Balıkesir, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Gastroenterostomi deneysel modeli ile duodenogastrik reflü oluşturulan sıçanlarda mide mukozasında metaplazi, displazi ve adenokarsinom döngüsünün siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü ve polifloral bal ile ne düzeyde engellendiğini histopatolojik ve immünohistokimyasal parametrelerle karşılaştırmalı olarak araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma kontrol grubu, COX-2 grubu ve bal grubu olmak üzere toplam 3 gruba ayrılarak gerçekleştirildi. Her bir deneğe gastrojejunostomi deneysel modeli yapıldı. Kontrol grubuna sadece standart rat yemi ve musluk suyu içirildi. COX-2 grubuna orogastrik yolla 5 mg/kg/gün meloksikam verildi. Bal grubuna orogastrik yolla 5 ml/kg/gün polifloral bal yedirildi. Her üç gruptaki ratlar ameliyattan 40 hafta sonra yüksek doz diyet eter inhalasyonu ile sakrifiye edildiler. Deneklerin mide ve anastomoz bölgesi mukozaları hemotoksilen-eozin (H-E) boyaması ile histopatolojik olarak ve COX-2 protein antikorları ve p53 protein antikorları ile immünohistokimyasal olarak incelendi.

**Bulgular:** Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme sonrasında kontrol grubunda 3 denekte (%30) anastomoz bölgesinde adenokarsinom geliştiği saptandı. COX grubunda 2 denekte (%22) anastomoz bölgesinde adenokarsinom geliştiği saptandı. Bal grubunda hiçbir denekte adenokarsinom gelişmedi. Bu verilere karşın, gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel farklılık elde edilemedi.

**Sonuç:** Duodenogastrik reflü içerdiği safra ve pankreas ekzokrin salgısı ile midede karsinojen etki göstermektedir. Deneysel çalışmamızın sonucuna göre polifloral bal bu karsinojen etkiyi ve kanser oluşumunu, selektif COX-2 inhibitörlerine göre daha güçlü bir şekilde engellemektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Duodenogastrik Reflü, Mide Kanseri, Selektif COX-2 İnhibitörü, Bal.

## ABSTRACT

### The Role of Duodenogastric Reflux in Development of Gastric Cancer: An Experimental Research of the Preventive Effects of Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Honey

**Objective:** The aim of this experimental study was to evaluate the preventive effects of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and polifloral honey on the gastric carcinogenesis in a duodenogastric reflux model.

**Material and Method:** Thirty-six rats were enrolled in the study and simple gastrojejunostomy was performed in all the animals. The rats were separated in three equal groups with 12 animals each. In the first group (control) only standard rat food and tap water were given. Additionally, 5mg/kg/day meloxicam and 5 ml/kg/day polifloral honey were given in the second (COX-2) and third (honey) groups respectively. Forty weeks after the operation, all rats were sacrificed with high dose diethyl ether inhalation. The mucosa of the anastomotic region and stomach was evaluated in light microscope with hematoxyline-eosin, and also immunohistochemistry was done with p53 and COX-2 antibodies.

**Results:** In control and COX-2 groups gastric adenocarcinoma was found in 3 (30%) and 2 (22%) animals respectively. In the polifloral honey group no adenocarcinoma was revealed. Despite these findings, a statistically significant difference was not found between the groups due to a small sample size.

**Conclusion:** The exocrine pancreatic secretion and bile induces a carcinogenic effect on the gastric mucosa in an experimental duodenogastric reflux model. In the present study we can conclude that the protective effect of polifloral honey is much more pronounced than the effect of COX-2 inhibitors.

**Keywords:** Duodenogastric Reflux, Gastric Cancer, Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Honey.

**Bu makale atıfta nasıl kullanılır:** Destek S, Gül VO, Kapran Y, Balık E, Buğra D, Akyüz A. Mide Kanseri Gelişiminde Duodenogastrik Reflünün Rolü: Siklooksijenaz-2 İnhibitörlerinin ve Balın Önleyici Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması. Fırat Tıp Dergisi 2019; 24 (1): 6-13.

**How to cite this article:** Destek S, Gul VO, Kapran Y, Balık E, Bugra D, Akyuz A. The Role of Duodenogastric Reflux in Development of Gastric Cancer: An Experimental Research of the Preventive Effects of Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Honey. Fırat Med J 2019; 24 (1): 6-13.

Mide adenokarsinomu, dünyada akciğer, meme ve

kolorektal kanserlerden sonra dördüncü (%8,6) sıklıkta

\*Yazışma Adresi: Vahit Onur GÜL, Edremit Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

Tel: 0266 373 1313

e-mail: vonurgul@hotmail.com

Geliş Tarihi/Received: 28.02.2017

Kabul Tarihi/Accepted: 27.03.2018

\* Bu çalışma European Society for Surgical Research Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (10-13 Haziran 2015, Liverpool, UK).

görülmektedir. Mide kanseri dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. İnsidansı, 50-70 yaşları arasında en yüksektedir. Etyolojisinde helicobakter pilori, tuzlu nitritli gıdalar, alkol, obezite, asbets, kömür maruziyeti, sigara, klorpromazin gibi ilaçlar vb faktörlerin rol oynadığı düşünülür. Tüm mide tümörlerinin %10'unda K-ras, p53, hMLH1 gibi gen bozuklukları görülmektedir. Mide polipleri, atrofik gastrit, metaplazi, displazi, peptik ülser, Menetrier hastalığı, geçirilmiş mide rezeksiyonları mide kanseri için predispozan faktörlerdir (1).

Duodenum gıda ile dolduğunda retrograd peristaltizm ile fizyolojik primer duodenogastrik reflü oluşabilir. Ancak pilorun rezeksiyonu veya by-pass edilmesi gibi işlemler sekonder duodenogastrik reflüye neden olur. Açlıkta ve yemek sonrasında pilor yoluyla oluşan primer duodenogastrik reflü ile midedeki neoplastik gelişim arasında potansiyel ilişki olduğu saptanmıştır. (2, 3).

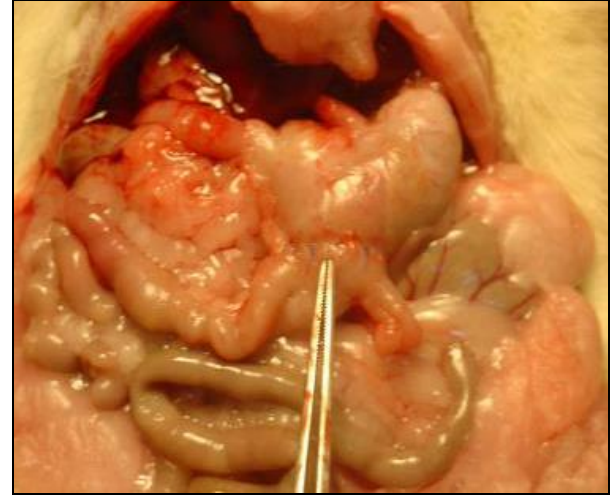
Selim hastalıklar nedeniyle yapılan mide cerrahisi sonrasında mide kanseri sayısında belirgin bir artış (%8,4) olduğu belirlenmiştir. Bunda da duodenogastrik reflü en sık üzerinde durulan sebeptir. Reflü ile mideye geçen safra ve pankreas ekzokrin salgıları, mide mukozasını tahriş ederek reaktif gastropatiye neden olur (4). Mide mukozasındaki malign değişim oranı, duodenogastrik reflünün derecesi ile doğru orantılıdır (5). Safra reflüsü; midenin münin bariyerine, yüzey aktif fosfolipidlerin oluşturduğu hidrofobik özellikteki lipid tabakaya, mukoza hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları noktalarına, submukozal mikrosirkülasyonuna zarar verir. Safra asitleri, siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu artırır. COX-2, kronik inflamasyonlu bölgelerde, inflamasyonun devamını sağlayarak epitelyal karsinogenezise zemin hazırlar (6). Safra asitleri, histamin, nitrik oksit, fibroblast büyüme faktörü sentezini ve epidermal büyüme faktörü reseptörleri aktivasyonunu da arttırır. Bu sebeplerle duodenogastrik reflü, mide mukozasında inflamasyon, ülserasyon, intestinal metaplazi ve daha sonra neoplazi gelişme riskinde artışa neden olur (7).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda balın orta derecede antitümör ve belirgin derecede antimetastatik etkileri olduğu, 5-fluorourasil ve siklofosamid gibi kemoterapötik ilaçların antitümör aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (8). Erken evre intestinal tipte mide kanserlerinde saptanılan COX-2'nin aşırı salınımıyla oluşan gastrik intestinal metaplazi, prekanseröz bir durumdur. Yapılmış çalışmalarda kolon kanserlerinde olduğu gibi mide kanserlerinde de COX-2 inhibisyonunun kanseri önleyici rolü olabilir (9).

Bu deneysel çalışmada sıçanlarda gastroenterostomi yapılarak insanlardakine benzer duodenogastrik reflü oluşturuldu. Duodenogastrik reflünün yol açtığı morfolojik değişiklikler, karsinogenezdeki rolü, bal ve COX-2 inhibisyonunun kanseri önleyici etkilerini araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda 44/2005 numaralı etik kurul onayı ile yapılan çalışmada ağırlıkları 175-250 gram (g) arasında değişen 36 adet erişkin erkek Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Denekler basit rastgele örnekleme yöntemiyle her biri 12 rattan oluşan 3 gruba ayrıldı. Deneklere laparotomi ile gastrojejunostomi yapıldı. (Şekil 1).



Şekil 1: Deneysel gastrojejunostomi modeli.

Grup I (kontrol grubu): Sadece standart kuru pelet yem ve su verildi.

Grup II (polifloral bal grubu): Standart rat yemi, su ve orogastrik yolla 2 ml su ile seyreltilerek 5 ml / kg/ gün polifloral doğal bal verildi.

Grup III (selektif COX-2 inhibitör grubu): Standart rat yemi, su ve orogastrik yolla 2 ml musluk suyu ile çözültilerek 5mg/kg/gün Meloksikam verildi.

Polifloral bal ve meloksikam dozajı daha önce sıçanlarda yapılmış olan deneysel karsinogenez çalışmaları esas alınarak belirlenmiştir (10-14).

Ratlar ameliyattan 6 saat önce aç bırakıldı ve intraperitoneal yolla 40 mg/kg Na-Thiopental verilerek anestezileri sağlandı. Anesteziyi takiben ratlar tartıldı. Karın cildi, traş edildi. Povidon-iyodür solüsyonu ile cerrahi alan temizliğini takiben ksifoid altından 3 cm'lik orta hat kesisi yapıldı. Duodenojejunal birleşim yerinin hemen distalinden seçilen proksimal jejunum ansı antekolik ve izoperistaltik olarak mide büyük kurvatur kenarına getirildi. Yaklaşık birer cm'lik gastrotomi ve enterotomi yapılarak 6/0 poliprolenle gastrojejunostomi gerçekleştirildi. Kanama kontrolünden sonra batın duvarı 3/0 ipekle kapatılarak ameliyata son verildi. Cerrahi girişim temiz ancak steril olmayan koşullarda gerçekleştirildi. Ameliyat sonrası kafeslerine geri alınan sıçanlara 6. saatte su, 24. saatte sıçan yemi verilmeye başlandı.

Grup I'deki deneklerden biri ameliyat sonrası 4. günde evvisserasyonu takiben, biri de ameliyat sonrası 15.

günde malnütrisyon nedeniyle kaybedildi. Grup II'deki deneklerden biri ameliyat sırasında, ikisi ameliyat sonrası 5. günde anastomoz kaçağından dolayı kaybedildi. Grup III'deki deneklerden biri anestezi esnasında, biri ameliyat sonrası 4. saatte kanama nedeniyle, biri de ameliyat sonrası 4. günde anastomoz kaçağı nedeniyle kaybedildi.

Ameliyat sonrası 40. haftanın bitiminde yaşayan toplam 28 sıçan (%78), tartıldıktan sonra yüksek doz dietil-eter inhalasyonu ile sakrifiye edildiler. Sakrifiye edilen deneklerin gastrojejunostomi bölgesi mide ve jejunumla beraber çıkarıldı.

Anastomoz bölgesi genişçe çıkarılarak 24 saat süre ile %10 nötral formalin ile mukoza tarafları üste gelecek şekilde tespit edildi. Standart doku takibi yöntemleriyle işlemden geçirilerek parafine gömüldü ve 3 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında kesildi. Kesitler H-E ile boyandı. Hazırlanan preparatların tümü, ışık mikroskopunda değerlendirildi. Histopatolojik olarak epitel dokuda Padova sınıflamasına uygun olacak şekilde kronik süperfisiyal gastrit, kronik atrofik gastrit, foveolar hiperplazi, intestinal metaplazi, kistik dilatasyon, displazi, adenokarsinom varlığı araştırıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmada monoklonal mouse anti-p53 Ab-8 antikoru ile diğeri monoklonal mouse anti-COX-2 Ab antikoru kullanıldı. Pozitif kontrol olarak anti-p53 antikoru için kolon adenokarsinomu kullanıldı. Bu çalışmayla COX-2 protein antikoru ve p53 protein antikoru kullanılarak mide dokusunda COX-2 ve p53 protein ekspresyonuna bakıldı. Kesitler deneyimli bir patolog tarafından değerlendirildi. Elde edilen sonuçlardan dijital kamera kullanılarak resim örnekleri alındı.

SPSS paket programı ile verilerin değerlendirilmesi yapıldı ve tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra grupların karşılaştırmasında Ki-Kare analizinde Montecarlo simülasyon yöntemi kullanıldı.

## BULGULAR

Ameliyat öncesi deneklerin ortalama vücut ağırlığı grup I'de 215 g, grup II'de 210 g, grup III'de 212 g olarak saptandı. Ameliyat sonrasında ise deneklerin ortalama vücut ağırlığı grup I'de 186 g, grup II'de 218 g, grup III'de 196 g olarak saptandı. Grup I ve III'de ameliyat sonrası takipte kilo kaybı, grup II'de kilo artışı saptandı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Ameliyat öncesi ve sonrası deneklerin vücut ağırlıkları.

Ortalama ağırlık (gr)	Ameliyat öncesi	Ameliyat sonrası	Değişim durumu
Grup I	215	186	%13 azalma
Grup II	210	218	%4 artma
Grup III	212	196	%8 azalma

Gastrojejunostomi bölgesinin makroskopik incelemesinde toplam 11 denekte (%39) patolojik değişiklikler

saptanırken, 17 denekte (%61) normal mukozal görünüm saptandı (Tablo 2) (Şekil 2).

**Tablo 2.** Gastrojejunostomi bölgesinde makroskopik bulgular.

Makroskopik bulgular	Grup I	Grup II	Grup III
Normal görünüm	3 (%30)	9 (%100)	5 (%56)
Polipoid lezyon	2 (%20)	0	1 (%11)
Mukozal ülser	2 (%20)	0	1 (%11)
Tümör	3 (%30)	0	2 (%22)



**Şekil 2.** Gastrojejunostomi bölgesinin makroskopik görünümü.

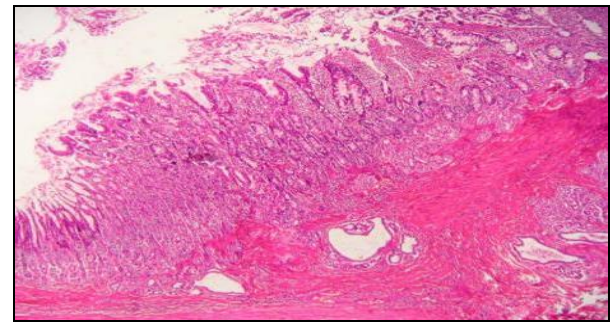
Gastrojejunostomi bölgesinin histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemesinde Padova sınıflamasına uygun şekilde ayırım yapıldı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Gruplardaki histopatolojik ve İmmünohistokimyasal bulgular.

Patolojik bulgular	KSG	KAG	FH	İM	KD	D	Ca	LI/III COX-2	P53
Grup I (n) (Yüzde)	5 (%50)	4 (%40)	3 (%30)	8 (%80)	4 (%40)	3 (%30)	3 (%30)	2 (%20)	0
Grup II (n) (Yüzde)	2 (%22)	0	1 (%11)	1 (%11)	0	0	0	0	0
Grup III (n) (Yüzde)	3 (%33)	2 (%22)	1 (%11)	2 (%22)	1 (%11)	0	2 (%22)	0	0

†† Dipnot: KSG: Kronik süperfisiyal gastrit, KAG: Kronik atrofik gastrit, FH: Foveolar hiperplazi, İM: intestinal metaplazi, KD: Kistik dilatasyon, D: Displazi, Ca: Adenokarsinom.

Gruplar arasında kronik süperfisiyal gastrit (KGS), kronik atrofik gastrit (KAG), foveolar hiperplazi (FH), intestinal metaplazi (İM), displazi (D) oluşma oranı açısından anlamlı bir farklılık görülmedi. ( $p > 0,05$ ) (Şekil 3).



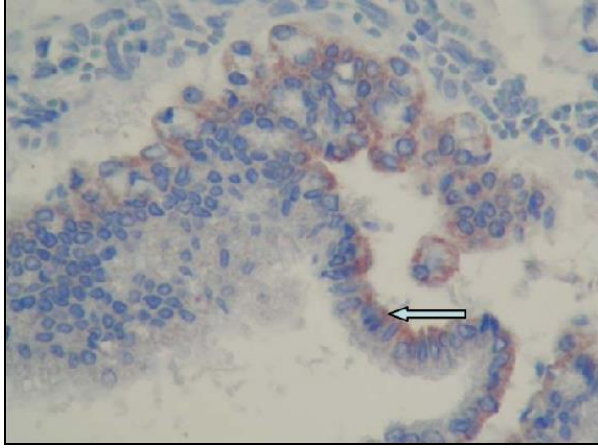
**Şekil 3.** Kronik süperfisiyal gastrit, kronik atrofik gastrit, foveolar hiperplazi, intestinal metaplazi, displazi alanları (H-E x 100).

Bunun yanı sıra Grup I de İntestinal Metaplazi (İM) oluşma oranı ise anlamlı derecede yüksek görülmektedir ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.** İntestinal Metaplazi oluşma oranı.

Gruplar	İntestinal Metaplazi Varlığı	p
Grup I (n:10)	8 (%80)	0,007
Grup II (n:9)	1 (%11)	-
Grup III (n:9)	2 (%22)	-

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise gruplar arasında COX-2 ekspresyonu oranı açısından anlamlı bir farklılık görülmemektedir ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4).

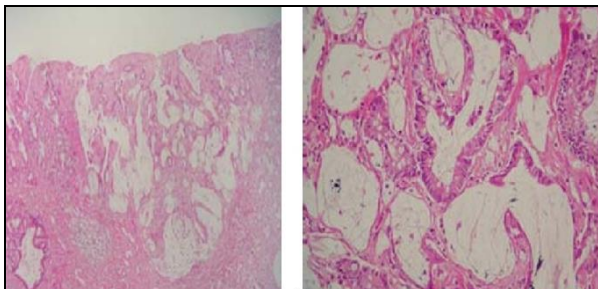
**Şekil 4.** COX-2 Ekspresyonu (H-E x 400).

Deneklerin hiçbirisinde p53 protein ekspresyonu saptanmadı. Kontrol amaçlı, monoklonal mouse anti-p53 Ab-8 antikoruyla immünohistokimyasal boyama tekrarlandı. Ancak yine p53 protein ekspresyonu saptanmadı.

Gruplar arasında kanser oluşma oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p > 0,05$ ). Bununla birlikte Grup 1'de kanser oluşma oranı daha yüksek çıkarken, Grup 2'de ise hiç gözlenmemiştir (%30) (Tablo 3). Yapılan çalışmada daha çok intestinal ve müsinöz tip adenokarsinomlar saptandı (Tablo 5) (Şekil 5).

**Tablo 5.** Deneklerde oluşan mide adenokarsinom çeşitleri

Tümör çeşitleri	Lauren sınıflaması İntestinal tip	WHO sınıflaması	
		Müsinöz tip	Tübüler tip
Grup I	3 (%60)	2 (%40)	1 (%20)
Grup III	2 (%40)	1 (%20)	1 (%20)

**Şekil 5.** Adenokanser (H-E x 100. x400).

## TARTIŞMA

Duodenogastrik reflü, antroduodenal motilitenin bozulmasıyla primer olarak (transpilorik) veya gastroduodenal anatomisinin cerrahi girişimi nedeniyle değişimi sonrasında sekonder olarak ortaya çıkar. Ameliyat sonrasında ortaya çıkan sekonder duodenogastrik reflüde daha fazla olmak üzere hem primer hem de sekonder duodenogastrik reflüye bağlı olarak 15-20 yıl içinde midede prekanseröz değişiklikler ve tümör gelişimi gözlenebilir (15).

Gowen (16), safralı kusması olan, mide ameliyatı geçirmemiş 42 hasta üzerinde yaptığı araştırmada hastaların tümünde kronik özofajit ve kronik gastrit, 3'ünde Barrett özofagus, 11'inde kronik atrofik gastrit, 10'unda intestinal metaplazi, 6'sında displazi ve 3'ünde mide ülseri saptamıştır. Primer duodenogastrik reflünün midede prekanseröz lezyonlara neden olduğunu göstermiştir.

Schindlbeck ve ark. (17), mide ameliyatı geçirmemiş ancak mide ülseri olan 30 hasta ve 66 sağlıklı insanı karşılaştırmıştır. Mide ülserli hastalarda açlık döneminde midedeki safra asitlerinin arttığı, mide asitinin azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular doğrultusunda mide ülseri patogenezinde yoğun safra asiti reflüsünün rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Sekonder duodenogastrik reflü sonrası midede kanser oluşumunu ortaya koymak için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar mide rezeksiyonu yapılan ve yapılmayan modeller ile N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), 2-amino-3-metilimidazo kinolin (IQ) gibi kanserojen madde verilen ve verilmeyen modeller üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bazı araştırmacılar cerrahi sonrası kanserojen madde verilen ve verilmeyen denekler arasında yaptıkları karşılaştırmada kanserojen madde kullanılanlarda %50, kullanılmayanlarda %0 mide kanserini geliştirdiğini saptamışlar ve kanserojen madde verilmeksizin tek başına duodenogastrik reflünün mide tümörü oluşturduğunu ve reflüyü önleyici cerrahi yöntemlerle bunun engellenebileceğini bildirmişlerdir (18).

Morgenstern (19) sıçanlarda vagotomi ve piloroplasti ameliyatı yaparak deneklerin %44'ünde mide adenokarsinomu geliştiğini saptamış, cerrahi sonrası oluşan aklorhidrinin midede kanserojen etki oluşturduğunu bildirmiştir. Biz çalışmamızda kanserojen madde kullanılmadık ve duodenogastrik reflünün doğrudan kanserojen etkisini olduğunu bulduk.

Pilor yoluyla geçen duodenogastrik reflünün mide kanseri oluştuğunu saptamak için Miwa ve ark. (20), erkek sıçanları 3 gruba ayırarak kanserojen madde vermeksizin rezeksiyonsuz ameliyatlarda yapmışlardır. Ellinci haftada, pilor yoluyla duodenogastrik reflü oluşturulan 1. gruptaki 17 sıçandan 7'sinde (%41) pilorik mukozada, gastrojejunal anastomoz yapılan 13 sıçandan 4'ünde (%31) anastomoz komşu antrum mukozasında adenokarsinom oluşmuş; gastrotomi yapılan 18 sıçandan (yalancı deney grubu) hiçbirisinde tümör gelişmemiştir. Gelişen tümörlerin daha çok iyi diferansiye tübüler adenokarsinom olduğunu belirtil-

miştir. Bu çalışmanın sonucunda duodenogastrik reflünün hem pilor mukozası, hem de antrum mukozası için güçlü bir karsinojen etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu ve diğer deneysel çalışmalarda, bizim çalışmamıza benzer bir şekilde sonuçlar çıkmıştır (13, 21, 22)

Bizim çalışmamızda da deneysel duodenogastrik reflü modellerinden kontrol grubunda 3 denekte (%30), selektif COX-2 inhibitörü verilen grupta 2 denekte (%22) mide adenokarsinomu gelişmiştir. Kontrol grubunda ortaya çıkan tümörlerden ikisinin (%40) müsinöz adenokarsinom, birinin (%20) tübüler adenokarsinom, selektif COX-2 inhibitörü verilen gruptaki tümörlerden birinin (%20) müsinöz adenokarsinom, diğerinin (%20) tübüler adenokarsinom olduğu saptandı.

Duodenogastrik reflü, midede COX-2 enzim sekresyonunu uyarır. Bu durum karsinojen etki oluşturur. Yasuda ve ark. (23), safra asitlerinin karsinojen etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada safra reflüsü olan 79 hastayı takip altına almışlardır. Hastaların hepsinde erken evre mide adenokarsinomu geliştiğini bulmuşlardır. Bu hastalara endoskopik mukozal rezeksiyon yapmışlar ve mide tümör hücrelerinde COX-2 aktivitesini araştırmışlardır. Pilorik bölgede gelişen tümör hücrelerinde %62, pilor dışı bölgede gelişen tümör hücrelerinde %30 oranında COX-2 aktivasyonu saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda safra asitlerinin COX-2 ekspresyonunu arttırdığını ve midede kansere neden olduklarını bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (24), özofagus adenokarsinomlu hastalardan Barrett epitel hücresi olarak yaptıkları hücre kültürlerinde kenodeoksikolat ve deoksikolat gibi dihidroksi safra asitlerinin protein kinaz C ve aktivatör protein-1 transkripsiyon faktörü yoluyla COX-2 ekspresyonunu ve PGE<sub>2</sub> düzeyini artırdığını saptamışlardır. Bunun yanı sıra konjuge safra asitlerinin COX-2 ekspresyonunu etkilemediğini göstermişlerdir. Dihidroksi safra asitlerinin COX-2 enzim ekspresyonunu arttırarak tümör oluşumunu başlattığını bildirmişlerdir.

Ancak bazı araştırmalarda da safra asitlerinin COX-2 ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiştir. Loogna ve ark. (25) faklı sıçan gruplarında H. pilori, MNNG, safra verdiği çalışmada; H. pilori ile safra verilen sıçanlarda ve MNNG verilen tüm sıçanlarda COX-2 artışı saptamışlardır. Sadece H. pilori ile MNNG verilen sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı Bcl-2 artışı bulmuşlardır. COX-2 ekspresyonunun korpus epitelinde, Bcl-2 ekspresyonunun antrum epitelinde arttığını göstermişlerdir. Çalışmanın sonunda safra asitlerinin tek başına COX-2 ve Bcl-2 ekspresyonunu değiştirmedini bildirmişlerdir.

Kawabe ve ark. (26), 51'i primer mide kanserli, 40'ı mide güdük kanserli 91 hastada yaptıkları araştırmada mide güdük kanserli hastaların 28'inde (%70), primer mide kanserli hastaların 38'inde (%74,5) COX-2 ekspresyonunun arttığını saptamışlardır. Kanserli dokuda COX-2 ekspresyonu artışı ile p53 ekspresyonu artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu saptamışlardır. H. pilori enfeksiyonu ile COX-2

ve VEGFR artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını saptamışlardır. COX-2 ekspresyonunun mide güdük kanseri oluşumunda önemli bir etkisinin bulunduğunu ve COX-2 inhibitörlerinin tümör oluşumunu engelleyebileceğini belirtmişlerdir.

Buna karşın yapılan deneysel bir çalışmada; spesifik COX-2 inhibitörü (Meloksikam) sıçan midesinde duodenogastrik reflünün neden olduğu tümöral lezyonların ilerlemesini önleyemediği gösterildi (27).

Bizim çalışmamızda deneysel duodenogastrik reflü modellerinden sadece kontrol grubunda %20 oranında COX-2 ekspresyonu saptanmıştır. Bunun yanı sıra deneysel duodenogastrik reflü modellerinden hiçbirisinde p53 protein ekspresyonu saptanmamıştır.

Yapılan bazı deneysel çalışmalarda selektif COX-2 inhibitörleri kullanılarak mide adenokarsinomunu engellenmeye çalışılmıştır. Hitoshi ve ark. (28, 29), atimik farelerin cilt altına insan mide kanser hücresi (MKN45) enjekte ederek yaptıkları çalışmada indometazin ve selektif COX-2 inhibitörünün, MKN45 hücrelerinde COX-2 ve PGE<sub>2</sub> düzeyini azalttığını saptamışlardır. Böylece hücre çoğalmasının baskılandığını, apoptozisin arttığını ve tümör hacminin küçüldüğünü göstermişlerdir. Mide adenokarsinom gelişiminde COX-2 ekspresyonunun önemli bir rolü olduğunu bildirmişler ve selektif COX-2 inhibitörleriyle tümör gelişiminin baskılanabileceğini göstermişlerdir.

Oyama ve ark. (30), deneysel duodenoözofageal reflü oluşturdukları sıçanları iki gruba ayırarak, selektif COX-2 inhibitörü (Nimesulid) verilen deney grubunda özofagus mukozasında COX-2 ve PGE<sub>2</sub> düzeyinin azaldığı saptanmışlar ve kontrol grubuna göre daha az özofajit geliştiğini, özofagus adenokarsinomu oluşmadığını göstermişlerdir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin, COX-2 ekspresyonunu baskılayarak özofagus adenokarsinomunu engellediğini bildirmişlerdir.

Zhou ve ark. (31), COX-2 inhibitörlerinin COX-2 ekspresyonunu azaltarak E-kadherin düzeyini ve apoptozisi arttırdığını, VEGF düzeyini ve mikrodamar yoğunluğunu azalttığını göstermişlerdir. COX-2 inhibitörlerinin kanser oluşumunu ve metastazını engellediğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda %30 mide adenokarsinomu saptanmıştır. Selektif COX-2 inhibitörü verilen grubun %22'sinde mide adenokarsinomu ortaya çıkmıştır. COX-2 selektif inhibitörü verilen sıçanlarda tümör gelişimi daha az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu durum denek sayısının az oluşuna bağlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda doğal balın antimikrobiyal, antioksidan, probiyotik, antiinflamatuvar, sitoprotektif, antiülser, antitümör ve antimetastatik etkileri olduğu ortaya konmuştur (32, 33).

Bilsel ve ark. (34), 64 sıçana rektal yolla 80 mg/kg trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) vererek kolit oluşturmuşlar ve rektal yolla verilen bal, prednizolon ve disülfiramın terapötik etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonunda balın antiinflamatuvar etkili olduğunu göstermişlerdir.

Somal ve ark. (35), Manuka balının *H. pilori*ye etkisini ortaya koymak için *H. pilori* taşıyıcısı mide ülserli hastalardan endoskopik biyopsilerle ülser kenarından örnekler almışlardır. Bunları farklı yoğunlukta bal katılan agar besiyerlerine ekerek, *H. pilori* üreme oranına bakarak; doğal balın ozmotik aktivite ve yapısındaki hidrojen peroksit nedeniyle *H. pilori*ye karşı kuvvetli antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hamzaoglu ve ark. (36), doğal balın tümör gelişimine etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada farelerin ense bölgesi deri altına önce 1 ml bal daha sonra  $8 \times 10^6$  Ehrlich tümör hücresi enjekte ederek yaptıkları çalışmada kontrol grubundaki tüm deneklerde, deney grubunun %26,6'sında ense bölgesinde tümör geliştiğini saptamışlardır. Doğal balın tümör gelişimini baskıladığı ve invazyonunu önlediğini bildiren yayınlar mevcuttur (37-44).

Yapılan çalışmalarda bazı hayvan modellerinde balın antitümör aktivitesi rapor edilmiştir. Bizim deneysel çalışmamızda da kontrol grubunda %30 mide adenokarsinomu ortaya çıkmışken, polifloral bal verilen grupta mide adenokarsinomu gelişmemiştir. Her ne kadar balın denek sayısının az olması nedeniyle ista-

tiksel olarak anlamlı bir veri elde edilememesine karşın balın antitümör etkilisinin olabileceği ortaya konmuştur.

Mide kanseri patogeneğinde duodenogastrik reflü ile midedeki neoplastik gelişim arasında potansiyel ilişki olduğu bilinmektedir. Bu deneysel çalışmamızda ratlarda gastroenterostomi ile sekonder duodenogastrik reflü meydana getirilmiştir. Daha da önemlisi bizim çalışmamızda deneklerde mide adeno kanser gelişmiş olması oluşturduğumuz modelin başarılı olduğunun önemli bir göstergesidir. Çalışmamızın sonuçları özellikle Selektif COX-2 inhibitörlerinin duodenogastrik reflünün midede oluşturduğu prekanseröz lezyonları ve adenokarsinomu belli bir dereceye kadar önleyebileceği, Polifloral doğal balın ise bunları daha etkili engelleyebileceği gözlenmiştir. Yüksek tedavi maliyetleri, iş gücü kayıpları ve ölümlerle sonuçlanma olasılığının yüksek olması ve hastanın yaşam kalitesinin düşmesi dikkate alındığında; kanserden korunma önem taşımaktadır. Sonuçlarımızın ileri düzey klinik araştırmalarla desteklenmesi gerekli olmakla beraber polifloral balın duodenogastrik reflü nedeniyle riskli hasta gruplarında kanser riskini azaltabileceği ve korunmaya katkıda bulunabileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9.
2. Koek GH, Vos R, Sifrim D, Cuomo R, Janssens J, Tack J. Mechanisms underlying duodeno-gastric reflux in man. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 191-9.
3. Szarszewski A, Korzon M, Kamińska B, Lass P. Duodenogastrik reflux: Clinical and therapeutic aspects. *Arch Dis Child* 1999; 81: 16-20.
4. Caygill CP, Hill MJ, Kirkham JS, Northfield TC. Mortality from gastric cancer following gastric surgery for peptic ulcer. *Lancet* 1986; 1: 929-31.
5. Taylor PR, Mason RC, Filipe MI, et al. Gastric carcinogenesis in the rat induced by duodenogastrik reflux without carcinogens: Morphology, mucin histochemistry, polyamine metabolism, and labelling index. *Gut* 1991; 32: 1447-54.
6. Miwa K, Hasegawa H, Fugimura T, et al. Duodenal reflux through the pylorus induces gastric adenocarcinoma in the rat. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2313-6.
7. Hashimoto K, Kakegawa T, Takeda J, et al. The effect of bile juice reflux on the development of remnant stomach carcinoma. *Kurume Med J* 1991; 38: 5-8.
8. Gribel NV, Pashinskii VG. The antitumor properties of honey. *Vopr Onkol* 1990; 36: 704-9.
9. Walker MM. Cyclooxygenase-2 expression in early gastric cancer, intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 347-9.
10. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 11: 1589-94.

11. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 21: 18563-9.
12. Gharzouli K, Gharzouli A, Amira S, Khenouf S. Prevention of ethanol-induced gastric lesions in rats by natural honey and glucose-fructose-sucrose-maltose mixture. *Pharmacol Res* 1999; 39: 151-6.
13. Wang X, Tang J, Cao Q. The effects of chronic bile reflux on the gastric mucosa of rats *Turk J Gastroenterol* 2013; 24: 251-9.
14. Mabrut JY, Collard JM, Baulieux J. Duodenogastric and gastroesophageal bile reflux. *J Chir (Paris)* 2006; 143: 355-65.
15. Saito T, Kurokawa Y, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Current status of function-preserving surgery for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 14: 17297-304.
16. Gowen GF. Spontaneous enterogastric reflux gastritis and esophagitis. *Ann Surg* 1985; 201: 170-5.
17. Schindlbeck NE, Heinrich C, Stellaard F, Paumgartner G, Müller-Lissner SA. Healthy controls have as much bile reflux as gastric ulcer patients. *Gut* 1987; 28: 1577-83.
18. Langhans P, Heger RA, Hohenstein J, Schlake W, Bünte H. Operation-sequel carcinoma of the stomach. Experimental studies of surgical techniques with or without resection. *World J Surg* 1981; 5: 595-605.
19. Morgenstern L. Vagotomy, gastroenterostomy and experimental gastric cancer. *Arch Surg* 1968; 96: 920-3.
20. Miwa K, Fujimura T, Hasegawa H, et al. Is bile or are pancreaticoduodenal secretions related to gastric carcinogenesis in rats with reflux through the pylorus? *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118:570-4.
21. Chen SL, Mo JZ, Cao ZJ, Chen XY, Xiao SD. Effects of bile reflux on gastric mucosal lesions in patients with dyspepsia or chronic gastritis. *World J Gastroenterol* 2005; 14: 2834-7.
22. Zlatić A, Stojanović M, Mihailović D, Dinić BR, Protić M, Veljković R. The role of duodenogastric reflux in formation of precarcinogenic gastric lesions--an experimental study. *R Med Pregl* 2013; 66: 285-91.
23. Yasuda H, Yamada M, Endo Y, Inoue K, Yoshida M. Elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with early gastric cancer in the gastric pylorus. *J Gastroenterol* 2005; 40: 690-7.
24. Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1998; 273: 2424-8.
25. Loogna P, Franzén L, Sipponen P, Domellöf L. Cyclooxygenase-2 and Bcl-2 expression in the stomach mucosa of Wistar rats exposed to *Helicobacter pylori*, N'-methyl- N'-nitro- N-nitrosoguanidine and bile. *Virchows Arch* 2002; 441: 77-84.
26. Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: Comparing it with p53 accumulation, *Helicobacter pylori* infection, and vascular endothelial growth factor expression. *J Surg Oncol* 2002; 80: 79-88.
27. Rodrigues PA, Naresse LE, Rodrigues MA, Kobayasi S. Late administration of a specific COX-2 inhibitor does not treat and/or prevent progression of gastric tumors in rats submitted to duodenogastric reflux procedure. *Int J Cancer* 2008; 123: 1491-8.
28. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998; 274: 1061-7.
29. Oba M, Miwa K, Fujimura T, Harada S, Sasaki S, Hattori T. Chemoprevention of glandular stomach carcinogenesis through duodenogastric reflux in rats by a COX-2 inhibitor. *Int J Cancer* 2008; 123: 1491-8.
30. Oyama K, Fujimura T, Ninomiya I, et al. Cyclooxygenase (COX)-2 expression in a rat duodenoesophageal reflux model and chemoprevention of adenocarcinoma by the selective COX-2 inhibitor nimesulide. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2007; 104: 1183-91.
31. Zhou Y, Ran J, Tang C, et al. Effect of celecoxib on E-cadherin, VEGF, microvessel density and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 269-75.
32. Math MV, Khadkikar RM, Kattimani YR. Honey a nutrient with medicinal property in reflux. *Indian J Med Res* 2013; 138: 1020-1.
33. Ghaffari A, Somi MH, Safaiyan A, Modaresi J, Ostadrahimi A. Health honey and apoptosis in human gastric mucosa. *Promot Perspect* 2012; 2: 53-9.
34. Bilsel Y, Bugra D, Yamaner S, Bulut T, Cevikbas U, Turkoglu U. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig Surg* 2002; 19: 306-11.
35. Al Somal N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J R Soc Med* 1994; 87: 9-12.

36. Hamzaoglu I, Saribeyoglu K, Durak H, et al. Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation. *Arch Surg* 2000; 135: 1414-7.
37. Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, et al. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. *Int J Urol* 2003; 10: 213-9.
38. Rao CV, Desai D, Rivenson A, Simi B, Amin S, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res* 1995; 55: 2310-5.
39. Abdel-Latif MM, Windle HJ, Homasany BS, Sabra K, Kelleher D. Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced nuclear factor-kappaB and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 1139- 47.
40. Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Lett* 2005; 579: 705-11.
41. Beretta G, Orioli M, Facino RM. Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med* 2007; 73: 1182-9.
42. Jaganathan SK, Balaji A, Vellayappan MV, et al. A review on antiproliferative and apoptotic activities of natural honey. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 15: 48-56.
43. Sadeghi-Aliabadi H, Hamzeh J, Mirian M. Investigation of Astragalus honey and propolis extract's cytotoxic effect on two human cancer cell lines and their oncogen and proapoptotic gene expression profiles. *Adv Biomed Res* 2015; 11; 4: 42.
44. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules* 2014; 21: 2497-522.

Sebahattin DESTEK	0000-0002-3569-4386
Vahit Onur GÜL	0000-0001-9071-0732
Dursun BUĞRA	0000-0001-7422-5016
Yersu KAPRAN	0000-0001-6725-664X
Emre BALIK	0000-0001-5751-1133
Ali AKYÜZ	0000-0001-9746-9873