

EĞRELTİ OTUNUN KOBAYLARDA İMMUN SİSTEM ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Taner Pamukçu²

Ersin İstanbulluoğlu³

A. Mahir Pamukçu⁴

An investigation of the effect of bracken fern on humoral system in guinea pigs.

Summary: *The effect of bracken fern feeding on humoral immun system was evaluated with IgG value analysis in animals from different groups. There were differences in IgG value between bracken fern fed and other groups. It is concluded that bracken fern has an immunosuppressive effect. BCG and thiabendazole did not reverse immunosuppressive effect of bracken fern. Thiabendazole has showed an temporary immune stimulant effect, but later it disappeared.*

Özet: *Bu çalışmada eğrelti otunun kobayların humoral bağışıklık sistemi üzerine olabilecek etkisi, gruplardaki hayvanların serum IgG değerlerinin mukayesesiyle incelenmiştir. Elde olunan sonuçlara göre, eğrelti otu humoral sistem üzerinde immunosupresif bir etkiye sahiptir. BCG ve tiabendazol gibi immunostimulanlar eğrelti otunun bu etkinliğini önleyememişlerdir. Tiabendazol geçici bir dönem için immünostimulan etki yapmış, fakat yedirmenin ileri dönemlerinde bu etki kaybolmuştur.*

Giriş

Canlının immunolojik yetmezliği ile kanser insidansı arasında yakın bir ilgi bulunduğu bilinmektedir (7). Kimyasal kanserojenlerin immunosupresif etkiye sahip oldukları ilk olarak 1952 yılında Malmgren ve ark. (19) tarafından ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda polisiklik aromatik hidrokarbonların (17, 18), aromatik aminlerin (8), niridazol (11, 15) ve nitroquinoline-N-oxide (6) ve N-4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl formamide (20) gibi tamamen değişik şimik yapıda olan bileşiklerin hem kanserojen ve hem de immunosupresif etkiye sahip oldukları bildirilmiştir.

Tabiatta bulunan kanserojenlerin çoğunluğu bitkilerin yapısında da bulunur ve bunlar aynı zamanda immunosupresif etkiye de sahiptirler (8, 15, 16). Kanserojen etkili bitkilerden en önemlisi ise eğrelti otu (Pteridium aquilinum) olup, birçok araştırmacı tarafından yapılan deneysel çalışmalarda bu bitkinin potent bir kanserojen olduğu ortaya konmuştur (2, 3, 5, 12-14, 19). Ancak, bugüne kadar eğrelti otunun immun sistem üzerine olan etkisi incelenmemiştir.

Bu çalışmada amaç, ülkemiz doğal florasında yaygın olarak bulunan ve sığırlarda sidik

kesesi kanserlerine neden olan eğrelti otunun, immun sistem üzerine olan etkisini incelemek, bakteriyel ve kimyasal immunostimulanlar ile immun sistemi kamçılayarak tümör insidansının ve immunosupresif etkinin azalıp azaltılmayacağını irdelemektir.

Materyal ve Metot

Deneme Hayvanları ve Yem: Bu demede 300-350 gr. ağırlığında 75 adet kobay kullanıldı. Bunlar beşer hayvanlık gruplar halinde tel kafeslere kondu ve normal kobay yemine 1/3 oranında eğrelti otu karıştırılarak (bu oran bir ön çalışma ile belirlendi) pelet haline getirilmiş diet ve normal kobay yemi (Ankara Yem Sanayii) ile beslendi. Çalışmada cinsiyet farkı gözletilmedi.

Yedirme Denemeleri: Deneme beş grup altında yapıldı ve bir yıl devam etti. Her grup 15'er kobaydan oluştu. Deneme süresince bazı gruplarda spontan ölümler görüldü ve bu hayvanlara ait incelemeler de değerlendirmelere alındı.

Birinci grup (A) hayvanlar deneme süresince eğrelti otu karıştırılmış yemle beslendi. Bu gruptan 5. ayda 1, 8. ayda 2 ve 9. ayda 3 kobay kendiliğinden öldü. Deneme süresi so-

1. Bu çalışmayı TÜBİTAK (Ankara) desteklemiştir. WHAG (383).
2. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara
3. F.A.O. Tarım Ateşesi, Belçika.
4. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden emekli.

nunda da kalan 9 kobay öldürüldü. Bu grup pozitif kontrol olarak kullanıldı.

İkinci gruptaki (B) hayvanlara kimyasal adjuvantların immunostimulan etkisini incelemek için eğrelti otu ile beslenmeye başlamadan önce 10-15 mg/kg. hesabıyla 6 hafta arayla iki doz halinde derialtı tiabendazol (Sharp-Dohme, U.S.A.) verildi. İkinci dozdan bir hafta sonra bu gruptaki hayvanlara da eğrelti otu içeren yem vermeye başlandı ve bu uygulamaya araştırmanın sonuna kadar devam edildi.

Üçüncü gruptaki (C) hayvanlar normal kobay yemi ile beslendi ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Bu grupta 2. dönemde bir kobay, 3. dönemin başlangıcında da 2 kobay kendiliğinden öldü. Kalan 12 hayvan da deneme süresi sonunda öldürüldü.

Dördüncü gruptaki (D) hayvanlara araştırmanın ilk üç ayında ayda bir defa 0.5 cc. miktarda derialtı BCG, immunostimulan etkisini incelemek için verildi. Bu dönemde hayvanlar normal kobay yemi ile beslendi. Daha sonraki dönemde ise bu gruptaki hayvanlara da deneme süresi sonuna kadar eğrelti otu içeren yem verildi.

Beşinci gruptaki (E) hayvanlar ise birinci grupta olduğu gibi deneme süresi başından sonuna kadar eğrelti otu içeren yemle beslendi. BCG'nin immunostimulan etkisini incelemek için bu gruptaki hayvanlara araştırmanın ilk üç ayında, ayda bir doz (0.5 cc.) deri altı BCG enjekte edildi.

Değişik zamanlarda ölen ve deneme süresi sonunda öldürülen bütün hayvanların tam nekropsileri yapıldı. Sidik keseleri uretradan verilen, %10 tamponlu formolle şişirilerek tesbit solüsyonu içine bırakıldı ve sonra da açılarak incelendi. Sidik kesesi ve aynı tesbit solüsyonunda tesbit edilen diğer doku örnekleri (dalak, karaciğer, böbrek ve akciğer) parafinde bloğa alındı ve kesitler hematoxylin-eosin ile boyandı.

Serum Örneklerinde İmmunoglobulin Analizleri: Gruplardaki tüm hayvanlardan deneme başlamadan önce bir defa ve araştırma süresince dört ayda bir periyodik olarak kan örnekleri alındı. Bunların serumları çıkartıldı ve serolojik inceleme için -20 C'de dondurularak saklandı. Daha sonra bu serumlarda, IgG kitleri (Miles Lab. U.S.A.) ile immunoglobulin analizleri yapıldı. IgM değer farkları, ona ait kit elde edilemediği için incelenemedi. IgG değerlerinin hesaplanmasında Single Radial İmmuno Diffusion yönteminden (1) yararlanıldı.

İstatistik Değerlendirmeler: Gruplar arasındaki IgG değerlerinin karşılaştırılmasında Wayne W. Daniel bioistatistik metodu kullanıldı (21).

Bulgular

Yedirme Denemesi: Sadece eğrelti otu ile beslenen 1. grupta (A) denemenin 5. ayında ölen 1 kobayın sidik kesesinde makroskopik olarak 0.3 cm. büyüklüğünde neoplastik bir üreme saptandı. İkinci dönemde ölen diğer 2 kobay ile üçüncü dönem başında ölen 3 hayvanda sidik keselerinde makroskopik herhangi bir lezyon saptanmadı. Deneme sonucu öldürülen 9 hayvanın 6'sının sidik kesesinde 0.3-0.5 cm. çapında birer adet neoplastik üreme bölgelerine rastlandı. Diğer 3 hayvanın sidik keseleri normal görünümde idi. Mikroskopik incelemelerde neoplastik alanlar infiltrati tipte transitional-cell carcinoma yapısındaydı. Son dönem ölen diğer üç hayvanın sidik keselerinde fokal hiperplazi sahaları seçildi. Diğerlerinin ise normal yapıda olduğu görüldü. Bu grupta üçüncü dönemde ölen veya öldürülen hayvanların dalağında retikulo-endotelial hiperplazi ve böbreklerde difuz veya fokal intersitisyel nefritis üç hayvanın akciğerinde de fokal intersitisyel pnömoni saptandı.

İkinci grupta (B), deneme süresi sonu öldürülen 15 hayvanın 7'sinde sidik kesesinde 0.4-0.5 cm çapında neoplastik oluşumlara rastlandı. Bunların da mikroskopik incelemesinde, infiltratif transitional-cell carcinoma olduğu belirlendi. Kalan hayvanların 4'ünün sidik keselerinde makro ve mikroskopik incelemede hiperplazi görüldü ve diğer 4'ünün sidik keseleri ise normaldi. Sidik kesesi tümörü olanlarda mikroskopik olarak dalakta retikulo endotelial hiperplazi, akciğerlerde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi.

Üçüncü grupta (C) ölen ve öldürülen hayvanların hepsinde sidik keseleri ve diğer dokular normal yapıda idi.

4. grupta (D) 6 hayvanda, 5. grupta (E) ise 5 hayvanda sidik keselerinde makroskopik yapıları diğer gruplardaki bulgulara eşdeğer, mikroskopik yapısı da transitional cell carcinoma olarak tanımlanan tümör odakları saptandı. Ayrıca mikroskopik incelemede her iki gruptan 4'er hayvanda sidik kesesinde hiperplazi ve üçer hayvanda da dalak dokusunda retikulo endotelial hiperplazi gözlemlendi. Diğer hayvanların dokuları normal görünümde idi.

Eğrelti otu ile beslenen tüm deneme gruplarındaki hayvanların barsaklarında tümör oluşumu saptanmadı.

Tablo 1: Deney Gruplarında serum immunoglobulin G (İgG) değerleri.

Dönem	Gruplar	n	x	sx	F
Birinci	A	15	653.3	22.61	A:B = 4.32 (xx) A:C = 1.95 A:D = 0.72 A:E = 0.045 B:C = 2.87 (xx) B:D = 5.16 (xx) B:E = 3.64 (xx) C:D = 0.045 C:E = 1.12 D:E = 1.54
	B	15	800.0	25.36	
	C	15	710.0	18.39	
	D	15	676.7	23.33	
	E	15	654.7	30.76	
İkinci	A	12	654.2	22.58	
	B	15	773.2	20.62	
	C	14	682.2	14.46	
	D	15	676.2	13.68	
	E	15	660.2	21.38	
Üçüncü	A	9	616.7	25.00	
	B	15	780.0	17.46	
	C	11	654.6	18.41	
	D	13	657.7	11.10	
	E	13	629.9	19.30	

xx: $p < 0.01$

İmmunoglobulin Analizleri

Bu incelemede eğrelti otunun yapısındaki immunosupresif maddelerin, IgG sentezinin oluşumu kısmen engelledikleri görüldü. Böylece negatif kontrol grubu hayvanların IgG değerleri ile deneme gruplarındaki hayvanların serum IgG değerleri arasında istatistiksel önemli farklılıklar ortaya çıktı ($p < 0.01$). BCG ve tiabendazol gibi immunostimulan madde uygulamaları ise eğrelti otunun immunosupresif etkisini engellemedi veya değiştiremedi. Tiabendazol grubunda başlangıçta saptanan immunostimulan etkinin geçici olduğu, IgG değerlerinin çalışmanın üçüncü döneminde BCG verilen gruplarla hemen hemen aynı düzeye geldiği gözlemlendi. Eğrelti otuyla beslenen birinci gruba, immunostimulan madde verilen 2., 4. ve 5. gruplar arasında IgG değerleri bakımından önemli farklılıklar görülmedi. Ancak bütün deneme gruplarındaki hayvanların serum IgG değerlerinin 1. dönem ortalamalarıyla 3. dönem ortalamaları arasında önemli farklılıklar saptandı. Bu sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlendi (Tablo-1).

Tartışma ve Sonuç

Eğrelti otunun çeşitli hayvan türlerinde sidik kesesi ve ince barsak tümörleri oluşturduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur (2, 3, 5, 12-14, 19). Gerek tabii ve gerekse deneysel oluşturulan bu tümörler arasında bir farklılık görülmediği bildirilmiş ise de araştırmalarda elde edilen sonuçlarda görülen heterogenite tümör oluşumunda organizmanın bağışıklık sistemi gücünün ve denemelerde kullanılan eğrelti otunun yapısındaki kanserojen maddelerin potansiyelinin önemli rol oynamadığını düşünmektedir.

Eğrelti otu ile yapılan yedirme denemelerinde, sığırlarda tabii olanlara çok benzeyen sidik kesesi kanserleri (12), sıçanlarda ince barsak ve sidik kesesi kanseri (3, 12), farelerde barsak ve sidik kesesi kanseri ile lösemi (13, 14) meydana getirilmiştir. Bu çalışmada da dört deneme grubunda eğrelti otunun kanserojen etkisi görülmüştür. Ancak hiçbir grupta, daha önceki çalışmalarda (3, 12, 13) saptandığı gibi ince barsak tümörlerine rastlanmamıştır. Sidik kesesi tümörlerinin makroskopik görünüşleri

gibi histolojik yapıları da önceki çalışmaları destekler özelliktedir.

Kanser oluşumu ile immun sistem arasındaki ilişkinin ortaya konmasından sonra biyolojik ve sentetik birçok mikroorganizma ve kimyasal madde kanserli hastalarda konakçının immun cevabını artırmak için kullanılmıştır (9, 22). Kanser tedavisinde immun sistemi uyararak için kullanılan sitimulanların belli başlıları BCG, *Corynebacterium parvum* ile Levamisole ve tiabendazol gibi bazı kimyasal maddelerdir (4, 9, 22).

Lundey ve ark. (9) yaptıkları çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan kanserin tedavisinde adjuvant olarak kullanılan tiabendazolün olumlu sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Zbar ve ark. (22) ise 10^6 sinjenik tümör hücresi enjekte ederek oluşturdukları tümör bölgelerine, enjeksiyondan 6 gün sonra canlı BCG süspansiyonunu intralezyonel olarak enjekte ederek uygulamanın tümör oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol ve ameliyatla tümör hücresinin alındığı gruplardaki hayvanlarda progresif tipte kanser oluştuğu halde, BCG verilen grupta ise uygulamadan 1 yıl sonra %58 oranında hayvan canlı kalmış ve tümör oluşumu tamamen kaybolmuştur. Bizim çalışmamızda ise gerek tiabendazol ve gerekse BCG'nin eğrelti otunun oluşturduğu idrar kesesi kanserleri üzerinde yukarıdaki çalışmaların (9,22) aksine olumlu bir etkisi görülmemiştir.

Bu çalışmada eğrelti otunun yalnız veya tiabendazol veya BCG ile birlikte alınmasında serum IgG değerlerinin yedirme süresince giderek düşmesi ve bu değerlerin normal yemle beslenen negatif kontrol grubun IgG değerlerinden oldukça düşük olması, eğrelti otunun immunosupresif etkisini göstermektedir. Bunun yanında tiabendazolün geçici bir süre için immunositimulan etki yapması, fakat bu etkinin yedirmenin ileri dönemlerinde kaybolması ve BCG'nin de eğrelti otunun immunosupresif etkisini değiştirmemesi ise diğer araştırmacıların (9, 22) verilerinin aksine bu maddelerin eğrelti otu ile yapılan çalışmalarda immunositimulan olarak kullanılmalarının yararlı olmayacağı sonucunu doğurmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma ile eğrelti otunun immunosupresif etkiye sahip potent bir kanserojen olduğu saptanmıştır. Ancak eğrelti otunun humoral immun sistem üzerine olan supresif etkisinin hücrese bağışıklık üzerinde olup olmadığı incelenmesi gereken bir husustur.

Kaynaklar

1. **Crowge, A.J.** (1973) Immunodiffusion. Acad. Press, London. 130.
2. **Evans, F.A.**, Bracken Carcinogenicity (1979) Res. Vet. Sci. 26: 339-348.
3. **Evan, I.A., and Mason, J.** (1965) Carcinogenic activity of Bracken fern. Nature, 208:913-917.
4. **Gordon, W., and Prager, M.** (1978). Effect of Levamisole on Normal and Malignant Murine Lymphocytes J. Nat. Cancer Inst, 61 (2) 415-421.
5. **Hirono, I., Sasaoka, I., Shibuya, C., Shimizu, M., Fushimi, K., Mori, H., Kato, K., and Haga, M.** (1975). Natural Carcinogenic products of plant origin. Gann. Monogr. Cancer Res 17: 205-217.
6. **Izhizawa, M., and Endo, H.** (1971). Mutagenesis of Bacteriophage T4 by a carcinogen. 4-Nitroquanidine I-Oxide, Mutat Res. 12:1-4.
7. **Kaplan, H. S., and Brown, M.B.** (1954) Development of Lymphoid Tumors in Nonirradiated Thymic Grafts in Thymectomized irradiated mice. Science. 119: 439-440.
8. **Kuroanagi, M., Fukuoka, M., Yoskihiro, K., and Notari, S.** (1974) The Absolute Configurations of pterins. 1-indanone Derivatives from Bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. Chem, Pharm, Bull, (Tokyo) 22:723.
9. **Lundy, I., Lovett, E.J.** 3rd., Conran, P., and Goldblatt. Pd. Thiabendazole a potential adjuvant in cancer therapy. Surgery, 80:636-640.
10. **Malmgren, R.A., Bennison, B.E., and Mckinley, T.W.** (1952) Reduced ANtibody Titers in Mice Treated with Carcinogenic and Cancer Chemotherapeutic Agents Proc. Soc. Exp. Biol, Med. 79, 484-488.
11. **Maher, V.M., Lesko, S.A., Straat, P.A., and Tso, P.** (1971) Mutagenic Action, Loss of Transforming Activity, and inhibition of Deoxyribonucleic acid Template Activity in-vitro caused by chemical linkage of carcinogenic polycyclic hydrocarbons to Deoxyribonucleic acid. J. Bact, 108:202-206.
12. **Price, J.M., and Pamukçu, A.M.** (1968). The Induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*), Cancer Res, 28:2247-2251.
13. **Pamukçu, A.M., Ertürk, E., and Bryan G.T.** (1977) Induction of urinary bladder and intestinal tumors in mice by feeding bracken fern. Vet. Fak. Derg. 24 (1): 28.
14. **Pamukçu, A.M., Ertürk, E., Price, E.D.M., and Bryan G.T.** (1972) Lymphatic leukemia and pulmonary tumors in female Swiss mice fed bracken fern (*Pteris aquilina*), Cancer Res. 32:1442-1445.
15. **Pelley, R., Pelly, R. J., Stavitsky, A.B., Mahmoud, A.F., and Warren, K. S.** (1975). Niridazole, a potent long-acting suppressant of cellular hypersensitivity. III. Minimal Suppression of antibody responses. J. Immunology, 115., 1477-1482.
16. **Prehp, R.T.** (1963). Reduced Antibody Titers in mice Treated with Carcinogenic and Cancer Chemotherapeutic Agents. J. Natl. Cancer Inst. 31, 791-805.
17. **Saito, M., Umeda, M., Enomoto, M., Hatanaka, M., Notori, S., Yoshihira, K., Fukuoka, M., and Kuroyanagi, M.** (1975). Function of Depressed Immunologic Reactivity During Carcinogenesis. Exbrientia 31:829-835.

18. **Stjernsward, J.** (1966). Cytotoxicity and Carcinogenicity of Pterosins and Pterosides, 1-Indanone Derivatives from Bracken (*Pteridium aquilinum*) *J. Natl. Cancer Inst.* 36:1189-1195.
19. **Wang, C. Y., Pamukçu, A.M., and Bryan, G.T.** (1976) Bracken fern a naturally occurring carcinogen, in medicine *Biologie Environment int. J. Bull. European Institute Ecology Cancer (INEC)*, Vol 4 Stock, C.C. Santamaria, L., Mariani, P., and Gorini, S. Ends., TECNOS, 565.
20. **Wang C.Y., Hayashida S, Pamukçu, A.M. et al.** (1976) Enhancing effect of alloparinol on the induction of bladder cancer in rats by N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2- thiazoly formamide. *Cancer Res.* 36:1515-1555.
21. **Wayne W. Daniel.** (1987) *Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences* Fifth edition VII-XII 1-740.
22. **Zbar, B., Ribí, E., and Rapp, H. J.** (1973) An experimental model for immunotherapy of cancer. *Natl. Cancer Inst. monog.* 39:3-9.