



Sıçanlarda Çölyak Hastalığı Oluşturma Potansiyeline Sahip Gliadin Maruziyetinde *Ferula pseudalliacea* Rech. f. Bitkisinin Sitoprotektif Etkileri

Cytoprotective Effects of Ferula pseudalliacea Rech. f. Herb Against Gliadin Exposure That Can Cause Celiac Disease

Hüseyin Güdücüoğlu¹, Gökhan Oto², İrfan Bayram³, Ahmet Cumhuri Dülger⁴, Mehmet Fırat⁵

¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ²Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, ³Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Van; ⁴Gastroenteroloji Bilim Dalı, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Giresun; ⁵Biyoloji Anabilim Dalı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Van, Türkiye

ABSTRACT

Aim: Celiac disease is a proximal small intestine disease that develops as a permanent intolerance in genetically susceptible people, primarily against gluten in wheat and other gluten-like grain proteins in cereals such as barley, rye, oats. In this study; in the experimentally generated celiac model in rats, cytoprotective effects of the water extracts of the aboveground parts of *Ferula pseudalliacea* Rech (FP) herb were examined.

Material and Method: Since no previous research on the FP herb has been identified, acute toxicity tests were performed first in mice and 3 treater doses were determined by probit analysis. Then, 9 groups (n=8) were formed in Wistar albino rats. On the 17th day, the study was terminated. After taken blood and tissue samples from rats, therapeutic effectiveness was evaluated by histopathological (proximal jejunum samples) and immunological and biochemical methods.

Results: According to the results of T-TG (Tissue Transglutaminase) IgA and IL (Interleukin)-15 ELISA, there was no statistically significant result between the groups in both parameters. AST (Aspartat Aminotransferaz Testi), protein, albüminde yüksek, glukozda düşük, ürede benzer; kreatinin submandibüler venden yapılan çalışmalara göre düşük, retroorbital yöntemle göre benzer olduğu saptanmıştır. Ayrıca Alk/P'ın (Alkaline phosphatase) yüksek, total bilirubin düşük, ürik asit yüksek olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik sonuçlara göre; dokuz grubun tamamı normal olarak değerlendirilmiştir.

Conclusion: Since mucosal damage could not be performed (IL-15 and T-TG IgA level low), inflammation did not occur. Liver damage occurred due to high Alk/P, AST. Creatine kinase level and bilirubin levels were normal indicating no muscle breakdown and normal bile ducts. Normal protein levels and normal urea levels indicate that bowel and kidney function were normal.

Key words: celiac; ferula pseudalliacea; hegedan; acute toxicity; gliadin; rat

ÖZET

Amaç: Çölyak hastalığı genetik olarak duyarlı kişilerde başlıca buğdaydaki gluten ve arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllardaki gluten benzeri diğer tahıl proteinlerine karşı kalıcı intolerans olarak gelişen proksimal ince barsak hastalığıdır. Bu çalışmada; sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan çölyak modelinde *Ferula pseudalliacea* Rech (FP) bitkisinin toprak üstü bölümlerinin su ekstraktlarının sitoprotektif etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metot: FP bitkisi üzerinde daha önce yapılan bir araştırma tespit edilemediği için öncelikle farelerde akut toksisite testleri yapılmıştır ve probit analizi ile tedavi edici 3 doz belirlenmiştir. Daha sonra Wistar albino cinsi sıçanlarda 9 grup (n=8) oluşturulmuştur. Akabinde 17. gün çalışma sonlandırılmıştır. Sıçanlardan kan ve doku numuneleri alındıktan sonra, histopatolojik (proksimal jejunum örnekleri) ve immünolojik ve biyokimyasal yöntemler ile terapötik etkinlik değerlendirilmiştir.

Bulgular: T-TG (Tissue Transglutaminase) IgA ve IL (Interleukin)-15 ELISA sonuçlarına göre her iki parametrede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. AST (Aspartat Aminotransferaz Testi), protein, albüminde yüksek, glukozda düşük, ürede benzer; kreatinin submandibüler venden yapılan çalışmalara göre düşük, retroorbital yöntemle göre benzer olduğu saptanmıştır. Ayrıca Alk/P'ın (Alkaline phosphatase) yüksek, total bilirubin düşük, ürik asit yüksek olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik sonuçlara göre; dokuz grubun tamamı normal olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Mukoza harabiyeti yapılamadığından (IL-15 ve T-TG IgA seviyesi düşük) inflamasyon oluşmamıştır. Alk/P, AST yüksekliğine bağlı karaciğer harabiyeti oluşmuştur. Kreatin kinaz seviyesi ve bilirubin seviyeleri normaldir buda kas yıkımının olmadığını ve safra kanallarının normal olduğunu gösterir. Normal protein seviyeleri ve normal üre seviyesi bağırsak ve böbrek fonksiyonunun normal olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Çölyak; ferula pseudalliacea; hegedan; akut toksisite; gliadin; rat

İletişim/Contact: Hüseyin Güdücüoğlu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye • Tel: 0532 665 84 91 • E-mail: hguducu@hotmail.com • **Geliş/Received:** 25.12.2019 • **Kabul/Accepted:** 17.07.2020

ORCID: Hüseyin Güdücüoğlu, 0000-0003-1101-9017 • Gökhan Oto, 0000-0001-7310-7800 • İrfan Bayram, 0000-0003-3093-4923 • Ahmet Cumhuri Dülger, 0000-0002-9328-5185 • Mehmet Fırat, 0000-0001-5814-614X

Giriş

Çölyak hastalığı (ÇH) (Gluten enteropatisi) genetik olarak duyarlı kişilerde başlıca buğdaydaki gluten ve arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllardaki gluten benzeri diğer tahıl proteinlerine karşı kalıcı intolerans olarak gelişen proksimal ince barsak hastalığıdır. Glutene duyarlı enteropati (gluten sensitif enteropati; GSE), çölyak “sprue” (nontropical sprue) olarak da adlandırılmakta ve otoimmün mekanizmalar ile gelişmektedir¹.

Çölyak hastalığı ince barsak mukozasında intraepitelyal lenfosit artışı, kript hiperplazisi ve villus atrofi bulguları ile tanı almaktadır². Ancak ince barsak biyopsisi yapılmadan önce tanıda ilk basamak olan anti gliadin antikor (AGA), anti-doku transglutaminaz antikor (anti-dTG) ve/veya anti-endomisyum antikorları (EMA) saptanmaktadır. Tanı sonrasında sıkı glutensiz diyet ile bu antikor düzeylerinin düşmesi veya tamamen kaybolması hastalığın takibi açısından önemlidir^{3,4}.

Tarama çalışmaları ile ÇH sıklığı tüm dünyada giderek artan bir eğri çizmektedir. Avrupa kökenli toplumlarda 1/85–1/300 (ortalama 1/100) arasında bildirilirken ülkemizde yapılan bölgesel çalışmalarda çocuklarda %1 civarında, erişkinlerde ve sağlıklı kan vericilerinde %0,8–1,3 arasında değişmektedir⁵.

Tanı serolojik antikorların pozitif olduğunun gösterilmesi sonrasında endoskopik ince barsak biyopsisinin yapılması ve tipik histopatolojik özelliklerin gösterilmesi ile konulmaktadır. Bu özellikler intraepitelyal lenfosit artışı, kript hiperplazisi ve “düz mukoza” olarak tanımlanan total villus atrofidir. Tedavi, ömür boyu sürecek glutensiz diyettir. Bu tedaviye sıkı bir şekilde uyulması hastalığın prognozu açısından önemlidir. Henüz alternatif tedavi yoktur. Sadece en az toksik prolamın içeren yulafın hastalarda diyete sokulması konusunda çalışmalar olmakla birlikte henüz kesin bir fikir birliği yoktur^{1,3}.

Çölyak hastalığının patogenezinde rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerden IL-15’in bloke edilmesi veya inhibitör bir sitokin olan IL-10 ile tedaviler de deneysel olarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ancak sonuçlar henüz kesin değildir ve yan etkileri nedeniyle glutensiz diyete alternatif olarak gösterilememektedirler⁶.

Apiacea familyasının tedavi edici potansiyele sahip birçok türü bulunmaktadır. Örneğin *Ferula gumosa*’nın antibakteriyel etkinliği bulunmaktadır⁷. *Ferula pseudalliacea* Rech. f. (FP) bitkisi Apiacea familyasından olup baharat olarak kullanılmaktadır⁸.

Bu çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmaya çalışılan çölyak modelinde halk arasında özellikle Hakkari/Türkiye yöresinde çölyak hastalığının tedavisinde kullanılan ve faydalı olduğu belirtilen FP bitkisinin toprak üstü bölümlerinin su ekstraktlarının sitoprotektif, biyokimyasal ve immünolojik etkileri incelenecektir.

Materyal ve Metod

Bu çalışmanın hayvan materyalini 116 adet Swiss albino fare ve yedi günlük 72 adet erkek Wistar albino ratlar oluşturmaktadır. Ratlara ve farelere günlük ışık ritmi altında standart pelet yem ve şehir şebeke suyu uygulandı. Gliadin [(G-3375; Sigma, USA)] çalışmada çölyak modeli oluşturmak için kullanılacak olan kimyasal materyali oluşturmaktadır (beden ağırlığına göre 1,5 mg/g). Bitki materyalini oluşturan FP (Yöresel adı: Hegedan yada Hingedan) Hakkari yöresinden toplanmış olup, Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü, sistematik laboratuvarında teşhis lupu yardımı ile adlandırması yapıldı. Gölgede kurutulan bitki materyali; 0,5 mm’lik elekten geçirilerek öğütüldü ve uygun laboratuvar koşullarında çalışma için hazır halde bekletildi.

Akut toksisite testi FP bitkisi üzerinde daha önce yapılan bir araştırma tespit edilemediği için öncelikle bu bitkinin tedavi edici dozlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle 6 farklı fare grubuna (n=8) FP’nin su ekstraktlarının 10 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 3000 mg/kg dozları uygulanarak ön değerlendirme ile tüm fareleri öldüren en düşük doz belirlendi. Daha sonra yeni oluşturulacak olan 8 grup farede (n=8) tüm fareleri öldüren en düşük dozdan itibaren belirli aralıklarda doz azaltılarak bitki ekstraktı uygulandı ve tüm gruplarda 72 saatlik gözlem yapılarak 24, 48 ve 72. saatlerde ölen fare oranlarına göre probit analizi yapıldı ve böylece LD50 dozu belirlendi. Daha sonra fareleri öldürmeyen ve terapötik doz aralığında olan üç uygun doz belirlenerek bu dozlar çalışma gruplarına uygulandı.

Deneysel Çölyak Modeli Oluşturma ve Tedavi Grupları⁹

Bu çalışmada Wistar albino cinsi sıçanlarda dokuz grup (n=8) oluşturuldu.

1. Grup: Kontrol grubunu oluşturdu ve standart bakım koşulları uygulandı.
2. Grup: Gliadin çözücüsü %1’lik 0,02 M asetik asit intragastrik yol ile yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde uygulandı.

3. Grup: Gliadin (1,5 mg/g) %1'luk 0,02 M asetik asit solüsyonunda çözülerek, intragastrik yol ile yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde uygulandı.
4. Grup: FP bitkisinin fare test sonuçlarına göre belirlenen terapötik 1. dozu yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde intragastrik yol ile uygulandı.
5. Grup: FP bitkisinin fare test sonuçlarına göre belirlenen terapötik 2. dozu yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde intragastrik yol ile uygulandı.
6. Grup: FP bitkisinin fare test sonuçlarına göre belirlenen terapötik 3. dozu yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde intragastrik yol ile uygulandı.
7. Grup: Gliadin (1,5 mg/g) yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde uygulandı daha sonra FP'nin 1. terapötik dozu gliadin uygulamalarından 4 saat sonra uygulandı.
8. Grup: Gliadin (1,5 mg/g) yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde uygulandı daha sonra FP'nin bitkisinin 2. terapötik dozu gliadin uygulamalarından 4 saat sonra uygulandı.
9. Grup: Gliadin (1,5 mg/g) yeni doğan ratların doğumlarının 7, 10, 13 ve 16. günlerinde uygulandı daha sonra FP'nin bitkisinin 3. terapötik dozu gliadin uygulamalarından 4, 17. gün sonrasında çalışma sonlandırıldı ve sıçanlardan kan ve doku numuneleri alındı, histopatolojik ve biyokimyasal yöntemler ile terapötik etkinlik değerlendirildi.

Histopatolojik Analizler

Proksimal jejunum örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Hematoksilen-Eosin ile boyanarak mikroskop altında değerlendirildi.

Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Testler

T-TG IgA ELISA kit (Mouse tissue transglutaminase ELISA Kit) (Mybiosource, USA) ve anti-IL-15 antibody, (Rabbit anti-Mouse IL-15 Polyclonal Antibody, Mybiosource USA) düzeyi ELISA yöntemiyle serumda belirlendi. Bunun yanında biyokimyasal parametreler aspartat transaminaz (AST), alkalin fosfataz (Alk/P),

albumin, protein, ürik asit, glukoz, kreatinin, total bilirubin, kan üre (BUN) (Architect C116200, USA) Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı tarafından hizmet alımı şeklinde yapıldı.

İstatistik Analiz

Üzerinde durulan özellikler için Tanımlayıcı İstatistikler; Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (ver: 21) istatistik paket programı kullanıldı.

Bu çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 27,102016 tarih ve 2016/10 karar numarasıyla onay alınmıştır.

Bulgular

Tablo 1'e göre T-TG (Tissue Transglutaminase) IgA (TG. A) ve IL (Interleukin)-15 ELISA sonuçlarına göre her iki parametrede de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Tablo 1. T-TG IgA ve IL-15'in gruplar arasında istatistiksel karşılaştırılması

	Grup	Median	Mean	St. Dev	Min.	Max.	p
T-TG, IgA	1	0,020	0,021	0,003	0,018	0,025	0,349
	2	0,016	0,017	0,005	0,010	0,025	
	3	0,019	0,055	0,074	0,010	0,210	
	4	0,031	0,058	0,062	0,014	0,180	
	5	0,026	0,062	0,071	0,010	0,190	
	6	0,024	0,037	0,038	0,013	0,130	
	7	0,023	0,053	0,064	0,010	0,180	
	8	0,019	0,019	0,009	0,010	0,038	
	9	0,020	0,022	0,009	0,013	0,038	
IL-15	1	0,530	0,370	0,261	0,054	0,620	0,554
	2	0,059	0,194	0,251	0,051	0,610	
	3	0,061	0,061	0,007	0,051	0,074	
	4	0,056	0,051	0,020	0,006	0,068	
	5	0,060	0,149	0,251	0,054	0,770	
	6	0,068	0,061	0,014	0,033	0,075	
	7	0,062	0,141	0,246	0,035	0,750	
	8	0,065	0,189	0,237	0,053	0,620	
	9	0,067	0,193	0,243	0,055	0,620	

Biyokimyasal değerlerin gruplar arası istatistiksel karşılaştırılmasına göre (Tablo 2) [(**Aynı sütunda farklı küçük harfi alan gruplar arası fark istatistik olarak*

anlamlıdır ($p < 0,05$)]; yaptığımız çalışmada ratlar için elde ettiğimiz klinik biyokimyasal parametreler, Mazzaccara ve ark.'nın yaptıkları çalışmadan¹⁰ alınmış

Tablo 2. *Biyokimyasal değerlerin gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması*

Grup	Median	Mean	Std. Dev.	Min.	Max.	*p	Grup	Median	Mean	Std. Dev.	Min.	Max.	*p		
AlbG	1	20,0	21,5	3,9	18,0	27,0	0,385	GluC	1	147,5	161,8 ^{ab}	51,2	126,0	284,0	0,018
	2	25,0	24,9	,8	24,0	26,0			2	130,0	131,6 ^b	17,2	108,0	167,0	
	3	25,0	24,9	1,6	21,0	26,0			3	132,5	131,8 ^b	4,8	122,0	137,0	
	4	24,5	24,5	1,7	21,0	26,0			4	147,5	147,8 ^{ab}	13,3	135,0	174,0	
	5	25,0	25,6	1,5	24,0	28,0			5	152,0	170,3 ^a	48,6	135,0	273,0	
	6	25,0	25,6	2,7	23,0	30,0			6	159,0	171,1 ^a	44,6	125,0	242,0	
	7	26,0	25,9	2,4	22,0	29,0			7	140,0	148,8 ^{ab}	22,3	128,0	190,0	
	8	22,5	24,5	4,5	20,0	33,0			8	128,5	132,4 ^b	20,4	109,0	164,0	
	9	24,5	24,8	1,6	23,0	27,0			9	157,0	156,0 ^{ab}	26,3	107,0	192,0	
Alk/P	1	405,0	513,3 ^{bc}	231,0	343,0	901,0	0,006	TP	1	42,5	48,0 ^b	11,6	36,0	66,0	0,018
	2	605,5	611,8 ^{abc}	290,3	292,0	1121,0			2	48,0	49,6 ^b	3,8	46,0	55,0	
	3	352,0	516,9 ^{bc}	248,4	338,0	970,0			3	49,0	48,6 ^b	2,0	46,0	52,0	
	4	299,0	452,6 ^c	226,2	253,0	733,0			4	52,5	54,0 ^b	8,6	43,0	72,0	
	5	800,0	823,0 ^a	98,0	729,0	1035,0			5	47,0	48,3 ^b	3,7	44,0	54,0	
	6	746,0	753,1 ^{ab}	100,5	578,0	881,0			6	50,0	50,3 ^b	5,6	43,0	59,0	
	7	704,0	688,9 ^{abc}	155,1	392,0	927,0			7	49,5	50,0 ^b	5,8	43,0	60,0	
	8	359,0	435,2 ^c	215,9	266,0	806,0			8	61,5	67,0 ^a	17,3	49,0	102,0	
	9	707,5	762,1 ^{ab}	306,7	371,0	1450,0			9	46,0	47,1 ^b	3,9	44,0	55,0	
AST	1	126,5	135,0	34,5	96,0	211,0	0,152	UA	1	1,0	1,1 ^{bc}	0,4	1,0	2,1	0,001
	2	118,5	120,1	11,1	103,0	135,0			2	1,1	1,2 ^{bc}	0,4	1,0	2,2	
	3	121,5	125,4	23,5	81,0	161,0			3	1,5	1,7 ^b	0,7	1,0	2,7	
	4	127,5	128,0	24,2	81,0	166,0			4	1,3	1,4 ^{bc}	0,5	1,0	2,4	
	5	139,0	150,0	33,6	115,0	215,0			5	1,9	2,2 ^a	0,8	1,6	4,2	
	6	124,0	124,0	22,7	89,0	164,0			6	1,4	1,6 ^{bc}	0,5	1,0	2,3	
	7	131,5	131,0	26,7	98,0	167,0			7	1,3	1,4 ^{bc}	0,4	1,0	2,2	
	8	94,0	102,9	23,9	76,0	136,0			8	1,0	1,0 ^c	0,0	1,0	1,1	
	9	129,5	137,3	21,4	113,0	163,0			9	1,3	1,4 ^{bc}	0,4	1,0	2,1	
BiliT	1	0,36	0,36 ^a	0,03	0,31	0,41	0,001	Urea	1	78,5	69,9 ^a	18,6	44,0	89,0	0,001
	2	0,30	0,30 ^{cde}	0,02	0,26	0,32			2	46,0	44,0 ^b	7,2	30,0	54,0	
	3	0,29	0,29 ^e	0,03	0,25	0,33			3	46,5	46,4 ^b	3,8	38,0	51,0	
	4	0,32	0,32 ^{abc}	0,03	0,28	0,38			4	40,0	40,6 ^b	4,6	35,0	49,0	
	5	0,32	0,33 ^{ed}	0,03	0,30	0,39			5	42,0	42,6 ^b	3,4	38,0	48,0	
	6	0,29	0,28 ^e	0,02	0,25	0,31			6	32,0	32,0 ^b	4,3	25,0	38,0	
	7	0,33	0,32 ^{bc}	0,03	0,29	0,35			7	45,0	44,6 ^b	5,0	39,0	53,0	
	8	0,32	0,32 ^{bc}	0,04	0,28	0,38			8	45,5	48,4 ^b	6,8	41,0	62,0	
	9	0,30	0,29 ^{de}	0,02	0,26	0,32			9	46,0	47,1 ^b	6,8	39,0	59,0	
CreaC	1	0,39	0,39 ^a	0,03	0,33	0,43	0,018								
	2	0,36	0,35 ^{bc}	0,02	0,31	0,38									
	3	0,36	0,36 ^{abc}	0,02	0,32	0,39									
	4	0,34	0,33 ^c	0,02	0,31	0,35									
	5	0,37	0,37 ^{ab}	0,03	0,34	0,41									
	6	0,38	0,38 ^{ab}	0,04	0,30	0,44									
	7	0,37	0,36 ^{abc}	0,03	0,30	0,39									
	8	0,34	0,33 ^c	0,04	0,27	0,39									
	9	0,36	0,35 ^{abc}	0,02	0,32	0,39									

*Aynı sütunda farklı küçük harfi alan gruplar arası fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

AlbG; Albumin globulin, Alk/P; Alkalen fosfat, AST; Aspartat Aminotransferaz, BiliT; Total bilirubin, CreaC; Kreatin kinaz, GluC; Glukoz, TP; Total protein, UA; Ürik asit, Urea; Üre

Tablo 3'teki¹⁰ normal değerler ile karşılaştırılmıştır. Buna göre elde ettiğimiz sonuçlar, Mazzaccara ve ark.'nın elde ettiği sonuçlara göre (Tablo 3)¹⁰; AST, protein, albumin sonuçlarımızın bu çalışma (Tablo 3) verilerine göre yüksek, yine çalışmamızda elde edilen glukozun adı geçen çalışma sonuçlarından düşük, ürede ise benzer olduğu, kreatinin değerimizin yine aynı çalışmaya göre araştırmacıların submandibüler venden elde ettikleri değerden düşük, retroorbital yöntemle göre yaptıkları çalışmaya göre araştırma sonucumuzun benzer olduğu saptanmıştır. Ayrıca Alk/P'un bizim çalışmamızda yüksek, total bilirubin düşük, ürik asitinde aynı araştırmaya göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

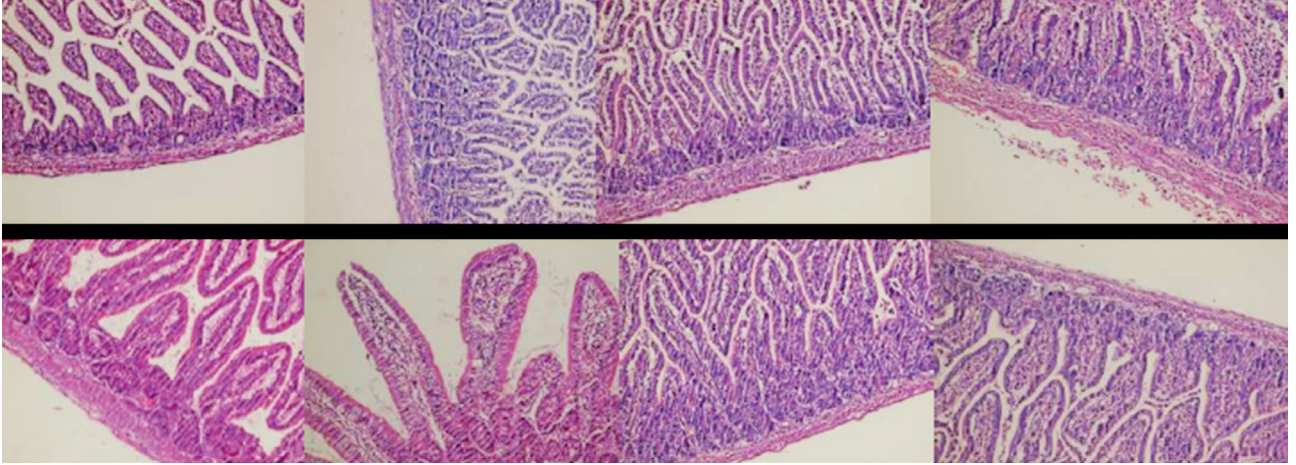
Histopatolojik Bulgular

Ratlarda deneysel olarak oluşturulmak istenen Çölyak hastalığına ait histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre; her grupta ortalama altı adet Wistar albino sıçan bulunan dokuz gruba ait dokular değişik zaman aralıklarında patoloji laboratuvarına teslim edildi.

Bu sıçanlardan ince barsak dokuları rezeke edildi. Duodenum, jejunum ve ileum'dan barsak duvarını tam kat içerecek şekilde ikişer tane örnek alındı. Bu örnekler 6–12 saat %10'luk tamponlu formalinde fikse edildikten sonra, doku takip cihazında takibe alındı, takip sonrası parafin bloklar haline getirilen dokulardan 4

Tablo 3. Farede klinik biyokimyasal parametreler¹⁰

Analyte	Mouse Strain						Inter strain differences ^a
	C57BL/6J		129SV/EV		C3H/HeJ		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
AST U/L	75	91 ^b	98	104	116	121	C57BL/6J p<0.001
	55–91	51–122	71–201	69–194	67–160	80–172	
ALT U/L	61	55	64	63	67	80	
GLU mmol/L	7.4 ^b	7.1	6.7	6.6	7.5 ^b	6.6	129SV/EV p<0.05
	5.6–9.1	5.2–12.2	4.1–9.9	4.7–8.4	6.3–8.6	5.6–8.3	
TP g/L	63	66	61	57	62	53	
	47–72	45–83	43–65	48–68	49–74	25–71	
Alb g/L	33	34	29	27	31	31	
TAG mmol/L	2.2 ^c	1.2	1.8	1.6	2.3	2.3	C3H/HeJ p<0.001
	1.1–2.9	0.6–1.8	0.9–4.5	0.7–4.8	1.7–6.0	1.0–3.8	
Chol mmol/L	2.6 ^b	2.1	3.2	3.1	3.5	3.4	C3H/HeJ p<0.001
Crea µmol/L	10.2	10.2	12.4	12.4	10.2	10.2	
	8.8–13.2	8.8–13.2	8.8–20.5	8.8–20.5	8.8–12.3	8.8–12.4	
BUN mmol/L	9.0 ^b	7.8	10.0 ^b	7.8	8.3 ^b	7.5	
ALP U/L	84	145 ^c	86	142 ^b	120	200 ^c	
	67–128	103–217	68–179	97–287	75–137	126–240	
t-Bil µmol/L	7.2	7.9	5.9	3.9	9.6	9.6	129SV/EV p<0.05
UA mmol/L	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
	0.1–0.6	0.1–0.7	0.1–0.3	0.1–0.3	0.1–0.6	0.1–0.5	



Şekil 1. Deneysel çölyak model oluşturulan grupları (dokuz grup) temsilen, %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilip Hematoksilen-Eosin ile boyanan proksimal jejunuma ait örneklerin mikroskopik patolojik fotoğrafları ((H&E boyası, orijinal büyütme x200).

mikron metre kalınlığında kesitler elde edildi ve mikroskopta incelenmek üzere Hematoksilen-Eozin (H/E) boyası ile boyandı.

Elde edilen H&E kesitlerinde Çölyak hastalığının histopatolojik tanısı için Marsh² (Tablo 4) tarafından tanımlanmış kriterlere göre değerlendirme yapıldı. Buna göre; dokuz grubun tamamı normal olarak değerlendirildi (Şekil 1). Her 100 enterositteki intraepitelyal lenfosit sayısında artış, kript hiperplazisi ve atrofi izlenmedi.

Not: Deneysel çölyak model oluşturulan grupları (9 grup) temsilen, %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilip Hematoksilen-Eosin ile boyanan proksimal jejunuma ait örneklerin bazılarını (her grubu temsilen çekilen mikroskopik fotoğraflar mikroskopik patolojik fotoğraflar) Şekil 1'de sunulmuştur (H&E boyası, orijinal büyütme x200).

Tablo 4. H&E kesitlerinde Çölyak hastalığının histopatolojik tanısında Marsh kriterleri²

Tip	Her 100 enterositteki intraepitelyal lenfosit (IEL)	Kript hiperplazisi	Villus
0	40'tan az	Yok	Normal
1	40'tan fazla	Yok	Normal
2	40'tan fazla	Var	Normal
3a	40'tan fazla	Var	Parsiyel atrofi
3b	40'tan fazla	Var	Subtotal atrofi
3c	40'tan fazla	Var	Total atrofi

Tartışma

Çölyak hastalığında alternatif tedavileri araştırmak için çaba harcanmaktadır. Bu hastalığın patogenezinde rol oynayan çeşitli moleküler hedefler üzerindeki etki mekanizmalarına dayanarak, bu tedaviler aşağıdaki beş geniş yaklaşımdan birine ayrılabilir. İlk yaklaşım, genetiği değiştirilmiş buğday kullanılarak, glutenin immünojenik içeriğinin azaltılmasına odaklanmaktadır. İkinci yaklaşım, gluten lümenindeki gluteni immünojenik peptitlere sindirilmeden ve emilmeden önce, çeşitli bağlayıcı ilaçlar kullanarak emilimini içerir. Üçüncü yaklaşım, bir zonulin antagonisti kullanarak, intestinal epitelyal sıkı bağlantılarla sindirilmiş glutenin alımını önlemeyi amaçlar. Dördüncü yaklaşım, bağırsak T-TG enzimi tarafından sindirilmiş glutenin immünojenikliğini arttırılmasını önlemek için T-TG inhibitörlerini içerir. Beşinci yaklaşım, intestinal mukozal epitel tabakası yoluyla, gluten immünojenik peptitlerin alımından sonra aşağı doğru immün aktivasyonu önlemeyi amaçlar. Bu potansiyel seçenekler heyecan verici görünmekle birlikte, şu anda en iyi ihtimalle glutensiz diyeti desteklemek yerine takviye etmek için kullanılabilirler¹¹. Bunların yanında gluten parçalayıcı enzimlerin (glutenaz), sorgulandığı geniş çaplı yapılan bir araştırmada bu tür enzimleri içeren diyet takviyelerinin yarar yerine zarar verdiği ve tavsiye edilmeyen ürünler olduğu gösterilmiştir¹². Fakat bu tür diyetler uygulanırken çok dikkat edilmeli, tedavi aşamasında klinik uygulama rehberleri göz önünde bulundurularak tedaviye bir diyetisyenin dahil edilmesinin gerekliliğinin altı çizilmektedir. Ancak ayrıntılı

beslenme önerileri ve beslenme yönetimi ile ilgili önemli konular, klinik uygulama rehberlerin çoğunda bulunmamaktadır¹³.

Tedavide gözlenen yetersizlikler çeşitli alternatif tedavi şekillerinin aranmasına neden olmuştur. Bu yüzden bu çalışmaya bizleri yönlendiren, yöresel olarak bu tür hastalarda kullanılan bir bitkinin ÇH'da da kullanılabilmesi yönündedir. Halk arasında Hingedan olarak bilinen FP bitkisinin hastalık üzerine iyi geldiği söylenmektedir.

FP bitkisi, *Ferula* (Apiaceae) cinsi içerisinde yer alıp, genellikle Orta Asya, Orta Doğu ve Orta Avrupa da yetişen yaklaşık 180 türden oluşmaktadır. *Ferula asa-fetida*, *Ferula gumosa* ve *Ferula latisepta* gibi bazı türler, mide ağrısı, histeri, bebek koliti ve astım tedavisinde kullanılmaktadır. FP İran'ın batısındaki Sanandaj dağlarının yerli bir türüdür¹⁴.

Bu nedenle FP bitkisi ÇH'nın tedavisinde kullanılması planlanmış ve materyal metotta belirtildiği gibi buna yönelik bir çalışma dizayn edilmiştir. Nikoukar ve ark.'larının⁹ yapmış oldukları yöntem esas alınmıştır. Çalışma bire bir uygulanmasına rağmen histopatolojik olarak adı geçen çalışmayı yapan araştırmacılar gibi barsak preparatlarında ÇH lehine herhangi bir değişiklikte karşılaşmamıştır. Buna rağmen çalışma materyal metotta bahsedildiği gibi devam ettirilmiş ve immünolojik ve biyokimyasal tanıda kullanılacak tüm parametreler çalışılmıştır.

IL-15 pleotropik bir sitokindir. Birçok yoldan inflamasyonu tetikler. Bunlar hastalık spesifik CD4 T hücrelerinin aktivasyonunu sağlayıp veya TGF- β sinyalinin yetmezliği durumunda, Treg'lerin baskılanmış aktivitesi ile Çölyak hastalığında sitotoksik intraepitelyal lenfositlerin olay yerine gitmesini sağlar. Enteropati ile ilişkili T hücreli lenfomanın gelişmesine yol açar. T-TG IgA ölçümü, çölyak hastalığı için yararlı bir tarama testidir. Titre, glutenin neden olduğu hastalık aktivitesini yansıtır; hastalık patogeneğinde doğrudan rolü daha az belirgindir. T-TG IgA gibi anti-anjiyogenik olanlar bazı ekstra bağırsak bulgularına katkıda bulunabilir¹⁵.

IL-15 seviyesi gruplar arası hem istatistiksel olarak ilişkisiz hem de yapılan çalışmalara göre çok düşüktür¹⁶. Bu da barsak mukozasında yeterince inflamasyonun gerçekleşmemesine bağlıdır. T-TG IgA çölyak hastalığında yapılan bir çalışmada *cut-off* seviyesi ≥ 10 U/ml alınmış olup elde edilen değerler bu değerlerin çok altındadır¹⁷. Bu durum inflamasyonun oluşmamasına bağlı olarak seviyesi düşük kalmıştır.

Karbonhidrat metabolizmasının bir ölçüsü olarak glikoz en sık değerlendirilen parametredir. Glikoz konsantrasyonu, beslenme, hormonlar, kış uykusu, kısıtlama, oruç tutmak ve anestezi dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir¹⁸. Tablo 3'e göre çalışmadaki glukoz konsantrasyonu düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak grup içerisindeki fark anlamlı kabul edilmiş 2. ve 3. grup arasında bir fark yoktur. FP bitkisinin özellikle dozu arttığında kan glukoz düzeylerinde arttığı söylenebilir. Fakat bu artışa gliadinin eklenmesiyle bir değişiklik olmamıştır (4 ve 7. gruplar).

Alk/P bizim çalışmamızda çok yüksek olarak tespit edilmiştir. Alk/P'nin en yüksek konsantrasyonları karaciğerde ve kemikte bulunur ve düşük konsantrasyonları ise böbrek tübüllerinde, intestinal epitelde, akciğer ve plasantada bulunmaktadır. Genç hayvanlarda kemik gelişimi yüksek Alk/P seviyeleri üretir. Alk/P'in konsantrasyonu türe göre değişmekle birlikte genel olarak yüksekliği sindirim, kolestaz veya bağırsak veya biliyer epitelde yaralanma ile olmaktadır. Alk/P düzeylerin düşüklüğü ise oruç, hipotiroidizm veya pernisiyöz anemi ile olmaktadır¹⁸. Alkalen fosfatın gruplar arası farkı istatistiksel olarak anlamlıdır. Özellikle RPRF bitkisi verildiğinde bu fark daha anlamlı olarak artmaktadır (ilk üç ve daha sonraki gruplar arasında). Fakat 4, 5, 6 ve gliadin ilaveli 7, 8, 9 gruplar arasında anlamlı bir artış olmamasına rağmen kontrol grubuna göre doz bağımsız bir artışın olduğunu söyleyebiliriz.

Aspartat aminotransferaz (AST) bir transaminazdır, aspartatın ve alfa-ketoglutaratın oksaloasetat ve glutamata dönüşümünü katalize eden enzimdir. AST enzimi daha önce serum glutamat oksalat transaminaz (SGOT) olarak biliniyordu ve kemik dışındaki tüm dokularda, karaciğerde ve iskelet kasında en yüksek seviyelerde mevcuttu. AST konsantrasyonu morarma, travma, nekroz, enfeksiyon veya karaciğer ve kas neoplazileri sonrası yükselir¹⁸. Gruplar arası AST istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Özellikle karaciğer enzimi olarak düşündüğümüz AST'nin FP bitkisine bağlamadan çalışmamızda kullanılan tüm deney hayvanlarında yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Kreatin kinaz (CK), kreatin fosfokinaz (CPK) olarak da bilinir ve kreatinin fosforilasyonunu katalize eden bir enzimdir. Kreatin kinazın en büyük aktivitesi kaslarda (CK-MM), kalpte (CK-MB) ve beyindedir (CKBB)¹⁸. Kreatinin gruplar arası istatistiksel olarak anlamlıdır. Fakat Tablo 3'e göre düşük (RO) ve benzer (SM) olarak

bulunmuştur. Bu da deney hayvanlarında herhangi bir kas yıkımı olmadığını göstermektedir.

Bilirubin, makrofaj-monositlerden üretilir ve hemoglobinin biliverdin'e ve bilirubine yıkılması ile oluşur. Bilirubin plazmadan karaciğere taşınır, bilirubin diglikoronid şeklinde konjüge edilir ve safradan atılır. Bilirubin seviyesi karaciğer ve safra yolu fonksiyonunun bir ölçüsü olarak işlev görür. Total bilirubin hem konjuge hem de konjuge olmayanları içerir. Eğer yükselirse karaciğer hasarı veya hemoliz göstergesi olarak kullanılır¹⁸. Bilirubin seviyesi gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı olsa da kontrol grubuna göre ilişkisiz bir yükseklik oluşmuştur. Tablo 3'e göre sonuçlarımızın düşük olduğunu söyleyebiliriz. Buda AST gibi deney hayvanlarında yüksek değerdir. Buna bağlı olarak karaciğerdeki safra atılımında sıkıntı olmadığını bu bitkinin safra kanallarında herhangi bir etki oluşturmadığını söyleyebiliriz.

Düşük total protein veya hipoproteinemi genellikle kronik yetersiz beslenme, emilim bozukluğu veya böbrek veya karaciğer hastalığı nedeniyle protein kaybı sonucu oluşur. Artan total protein veya hiperproteinemi dehidratasyonun neden olduğu, bunun yanında kronik enfeksiyon, şok veya metabolik bir rahatsızlık sonucu yaygın olarak görülmektedir¹⁸. Total proteinin ve albuminin her ikisinin de yüksek olması deney hayvanlarının gastrointestinal sisteminde herhangi bir sıkıntının olmadığını göstermektedir. Barsak mukozasının bozulması yönünde verilen asit ve gliadin çözeltilerinin (Grup 2 ve 3) ve daha sonra verilen tek başına RF bitkisi (4, 5 ve 6) ve ilavesinde verilen gliadin ve asit ilavesinin (7, 8 ve 9) barsak sisteminde herhangi bir etki oluşturmadığını söyleyebiliriz.

Albumin, elektroforez ile ortaya çıkan ilk fraksiyon olup baskın serum proteindir. Albumin karaciğerde üretilen ve intravasküler bölme içinde ozmotik basıncın korunmasına yardımcı olur¹⁸. Albumin seviyesi Tablo 3'e göre çok yüksektir. Fakat gruplar arası istatistiksel olarak anlamsızdır. Buda protein seviyesi gibi barsak mukozası özellikle verilen asidik ve gliadin solüsyonu ile herhangi bir değişikliğe uğramıştır.

Üre, proteinlerin parçalanmasıyla üretilir ve idrarla atılır. Kan üre azotu (BUN) sıklıkla laboratuvar hayvanlarında böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için kullanılır. Kan üre azot seviyesi sirkadiyen ritim, diyet, karaciğer fonksiyonu, hidrasyon ve bağırsak emilimi nedeniyle etkilenmektedir¹⁸. Gruplar arası fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır. Çalışmamızdaki

üre seviyesi Tablo 3'e göre normal sonuçlarla benzer olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanlarının böbrek fonksiyonlarının normal olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada amaç ilk önce deney hayvanlarında çölyak model oluşturmak ve daha sonrada oluşan bu model üzerinden FP bitkisinin tedavide etkisini incelemektir. Fakat kullanılan yöntemin⁹ bire bir aynısı yapılmasına rağmen bu model oluşturulamamıştır. Fakat yine de çalışma (kontrol, asit, gliadin ve FFP bitkisinin kan düzeyleri açısından etkilerinin görülebilmesi amacıyla) sürdürülmüştür. T-TG IgA ve IL-15 düzeylerinde normal seviyelerin çok altında sonuçlar elde edilmiştir. Yani barsak mukozasında herhangi bir inflamasyon oluşturulamamıştır. Daha sonra yapılan biyokimyasal incelemede bazı değerlerin normale göre yüksek (AST, Protein, Albumin, Alk/P, ürik asit), aynı [(üre, kreatinin (RO da benzer)) veya düşük [glukoz, kreatinin (SM), Total bilirubin] sonuçlar elde edilmiştir. Bu biyokimyasal sonuçlara göre normal barsak mukozasına bağlı olarak normal bir emilim gerçekleşmiş ve özellikle protein seviyeleri yüksek seyretmiş fakat karaciğer fonksiyon testleri etkilenmiştir. Patolojik sonuçlar irdelendiğinden de normal patolojik sonuçlarla karşılaştırılmış (Şekil 1) kullanılan metodun tekrar edilebilirliğinin olmadığı görülmüştür.

Çölyak hastalığı hala günümüzde tedavi açısından diyet kısıtlaması dışında etkili bir tedavinin olmaması nedeniyle önemlidir. Yapılacak yeni çölyak modelleri ile kullanılması düşünülen çeşitli tedavi maddelerinin denemelerinin gelecekte yapılması çok önemlidir.

Tesekkür

Bu proje Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje Kodu: TSA-2017-5858) desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Maki M, Lohi O. Celiac Disease. In: Walker WA, Goulet O, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson IR (eds). Pediatric Gastrointestinal Disease. 4th ed. Ontario: B.C. Decker, 2004:932-43.
2. Marsh M. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). Gastroenterology 1992;102:330-54.

3. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S et al. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Guideline for the Diagnosis and Treatment of Celiac Disease in Children: Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:1-19.
4. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease:an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636- 51.
5. Karaahmet F. Çölyak hastalığında teşhis süresi, *Ege Tıp Dergisi* 2018;57(4):228-231.
6. Rodrigo L. Investigational therapies for celiac disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1865-73.
7. Eftekhari F, Yousefzadeh M, Borhani K. Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia*. 2004;75(7-8):758-9.
8. Seidemann, J, *World Spice Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy*, 2005, Springer, 156 p.
9. Nikoukar LR, Nabavizadeh F, Mohamadi SM, Moslehi A, Hassanzadeh G, Nahrevanian H et al. Protective effect of ghrelin in a rat model of celiac disease. *Acta Physiol Hung* 2014, 101(4):438-47.
10. Mazzaccara C, Labruna G, Cito G, Scarfò M, De Felice M, Pastore L et al. Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *PLoS One* 2008;3(11):e3772.
11. Yoosuf S, Makharia GK. Evolving Therapy for Celiac Disease. *Front Pediatr*. 2019 14;7:193.
12. Krishnareddy S, Stier K, Recanati M, Lebowitz B, Green PH. Commercially available glutenases: a potential hazard in celiac disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2017;10(6):473-481.
13. Theodoridis X, Grammatikopoulou MG, Petalidou A, Patelida M, Gkiouras K, Klonizakis M et al. Dietary management of celiac disease: Revisiting the guidelines. *Nutrition* 2019;26;66:70-77.
14. Theodoridis X, Grammatikopoulou MG, Petalidou A, Patelida M, Gkiouras K, Klonizakis M et al. Disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*, and determination of their absolute configurations. *Phytochemistry* 2012;78:170-8.
15. Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr* 2018;6:350.
16. Kapilevich LV, Kironenko TA, Zakharova AN, Kabachkova AV, Orlov SN. Level of Interleukins IL-6 and IL 15 in Blood Plasma of Mice after Forced Swimming Test. *Bull Exp Biol Med* 2017;163(1):10-13.
17. Danielsson O, Lindvall B, Hallert C, Vrethem M, Dahle C. Increased prevalence of celiac disease in idiopathic inflammatory myopathies. *Brain Behav* 2017;5:7(10).
18. Ida Washington M, Van Hoosier G. *Clinical Biochemistry and Hematology In: Suckow M.A., Stevens K.A., Wilson R.P. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents, American College of Laboratory Animal Medicine* 2012, p:57-116.