

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA TİYOASETAMİT İLE OLUŞTURULAN  
FULMİNAN HEPATİK YETMEZLİKTE GİNGKO  
BİLOBA, VİTAMİN E VE MELATONİNİN BAKTERİYEL  
TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Ulvi DEMİREL  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI  
TEZ DANIŞMANI  
Yard. Doç. Dr. M. M. Murat HARPUTLUOĞLU  
MALATYA-2006**

**İÇİNDEKİLER**

Giriş	1
Genel Bilgiler	4
Gereç ve Yöntem	
1. Çalışmanın Hipotezleri	9
2. Araştırmanın Tipi	9
3. Araştırmanın İnsan Gücü	9
4. Hayvanlar	9
5. Fulminan karaciğer yetmezliğinin oluşturulması	10
6. Deneyin tasarımı	10
7. Örneklerin alınması	10
8. Karaciğer ve barsak histolojisi	11
9. Biyokimyasal analizler	11
a. Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması	11

- b. Kan amonyak analizi 12
- c. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi 12
- d. Serum AST, ALT düzeyleri 12
- 10. Mikrobiyolojik çalışmalar 12
  - a. Bakteriyel translokasyon 13
  - b. İntestinal Bakteriyel Overgrowth (İBO)'un değerlendirilmesi 13
- 11. Survı oranları 13
- 12. İstatistik 14

## Bulgular 15

- 1. Mortalite ve survı oranları 15
- 2. Karaciğer enzimleri 16
- 3. Oksidatif stres sonuçları 17
- 4. İBO ve BT 18
- 5. Karaciğer ve barsak histolojisi 20

## II

### Tartışma 23

### Sonuç ve Öneriler 29

### Özet 30

### Summary 32

### Kaynaklar 34

## III

### ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Sakrifikasyon günü grupların mortalite sayısı ve survı oranları (%)

Tablo 2. Gruplara göre serum amonyak, AST ve ALT düzeylerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri.

Tablo 3. Gruplara göre serum, karaciğer ve barsak tiyobarbiturik asit-reaktif substansları (TBARS) düzeylerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri.

Tablo 4. Gruplara göre ileal aspiratta üreyen *Eschericia coli* sayısı ( $\times 10^3$  CFU/ml olarak) ve bakteriyel translokasyon sıklığı.

Tablo 5. Gruplara göre karaciğer nekroz ve inflamasyon skorlarının ortalama  $\pm$  SD değerleri.

Tablo 6. Gruplara göre barsak mukozal ünite, ödem, lamina propriada inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vazodilatasyon skorlarının ortalama  $\pm$  SD değerleri.

## IV

### ŞEKİLLER DİZİNİ

Figür 1. Gruplara göre serum amonyak düzeyi

Figür 2. Gruplara göre karaciğer TBARS düzeyleri

Figür 3. Gruplara göre barsak TBARS düzeyleri

Figür 4. Gruplara göre ileal aspiratta üreyen *E.coli* sayısı ( $\times 10^3$  CFU/ml)

Figür 5. Kontrol grubu (a), TAA grubu (b), TAA+GB grubu (c), TAA+ Vitamin E grubu (d) ve TAA+ melatonin (e) grubunda karaciğer histolojisi.

Figür 6. Kontrol grubu (a), TAA grubu (b), TAA+GB grubu (c), TAA+ Vitamin E grubu (d) ve TAA+ melatonin (e) grubunda barsak histolojisi.

## V

### SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**FKY:** Fulminan karaciğer yetmezliği

**MOYS:** Multiorgan yetmezlik sendromu  
**BT:** Bakteriyel translokasyon  
**ROS:** Reaktif oksijen species  
**İBO:** İntestinal bakteriyel overgrowth  
**PAF:** Platelet-aktivatör faktör  
**GB:** Gingko biloba  
**Vit E:** Vitamin E  
**Vit C:** Vitamin C  
**Mel:** Melatonin  
**AT:** Alfa-tokoferol  
**RNS:** Reaktif nitrojen species  
**TAA:** Tiyooasetamit  
**TBARS:** Tiyobarbiturik asit-reaktif substans  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen peroksit  
**-OH:** Hidroksil radikali  
**TCA:** Trikarboksilik asit  
**TMOP:** Tetrametoksipropan  
**TBA:** Tiyobarbiturik asit  
**EMB:** Eosin Methylene Blue  
**CFU:** Colony-forming units  
**AST:** Aspartat transaminaz  
**ALT:** Alanin transaminaz

1

## **GİRİŞ**

Fulminan karaciğer yetmezliği (FKY) nedeniyle takip edilen hastalarda infeksiyonlar mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. Bu tabloda görülen infeksiyon etkenleri genellikle gram negatif bakterilerdir ve hastanın kendi barsak florasından köken almaktadır (1-3). Yoğun bakım hastalarında sıklıkla bakteriyemiye yol açacak herhangi bir infeksiyon odağı tespit edilememektedir (4). Bir çalışmada sepsis gelişen hastaların %34'ünde herhangi bir septik odak bulunmadığı bildirilmiştir (5). Normal şartlarda barsak mukozası lokal defans bariyeri olarak fonksiyon görür (6). Bakteriyel translokasyon (BT), barsaktan ekstraintestinal alanlara bakteri ve ürünlerinin pasajı olarak tanımlanmaktadır. FKY'de barsaktan artmış BT mevcuttur (7-9). Deneysel siroz, intestinal iskemi/reperfüzyon ve yanık modellerinde intestinal oksidatif stresin BT gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (10-12). Yanık, cerrahi stres ve multiorgan yetmezlik sendromu (MOYS) gibi klinik tablolarda ortak özellik intestinal hipoperfüzyondur. İntestinal hipoperfüzyon barsakta reaktif oksijen species (ROS)'lerin üretimini artırarak direkt lipid peroksidasyonuna ve barsak duvarında lökosit infiltrasyonuna yol açan proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. Tüm bu etkiler intestinal bariyer disfonksiyonuna neden olur (4,13-15). İntestinal hasarın intestinal bariyeri bozarak bakteriyel translokasyona katkıda bulunduğu siroz gibi birçok deneysel portal hipertansiyon modelinde gösterilmiştir (10,16,17). Barsakta artmış oksidatif stresin bir diğer sonucu intestinal dismotilitedir. İntestinal dismotilitenin sirozda artmış bakteriyel translokasyonda önemli rol oynayan

intestinal bakteriyel overgrowth (İBO)'a neden olduğu bildirilmiştir (10).

Antioksidanların BT'ı azalttığı gösterilmiştir (9-11). İntestinal hasarda rol oynayan bir diğer faktör platelet-aktivatör faktör (PAF) dır. Karaciğer ve barsak dokusundaki çalışmalarda PAF'ın inflamasyonda önemli bir mediatör olduğu ve bu inflamasyonun PAF antagonistleriyle azaltılabileceği gösterilmiştir (18,19). Akut pankreatit ve intestinal iskemi/reperfüzyon modellerinde PAF antagonistlerinin BT'ı azalttığı gösterilmiştir (20,21).

Gingko biloba (GB) antioksidan ve PAF antagonistik etkilere sahip bitkisel bir ekstraktır (22-24). Antioksidan etkisiyle birçok dokuda doku hasarını azalttığı bildirilmiştir (25-30). Ayrıca hepatotoksisite modellerinde lipid peroksidasyonunu azaltarak karaciğer hasarını düzelttiği bildirilmektedir (31-33). Ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyon ve duodenal ülser modellerinde intestinal oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (34-35).

Güçlü bir antioksidan olan Vitamin E (Vit E) preparatlarındaki hakim form  $\alpha$ -izoformu (Alfa - tokoferol) dur. Alfa-tokoferol (AT), ROS ve reaktif nitrojen species (RNS)'lerinin çok güçlü bir scavengeri (süpürücüsü) olarak fonksiyon görür (36). Vit E'nin özellikle  $\alpha$  formu inflamasyonu önler (37). Vit E'nin birçok intestinal hasar modelinde intestinal oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (38-42). Vit E'nin tiyoasetamit (TAA) ile oluşturulmuş hepatotoksisite modellerinde karaciğerde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (43,44). Vit E'nin ratlarda intestinal obstrüksiyon modelinde intestinal mukozada protektif etki gösterdiği ve BT'ı istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde azalttığı bildirilmiştir (45).

Direkt ve indirekt antioksidan etkileri bulunan melatonin vücutta birçok fizyolojik, immünolojik ve biyokimyasal işlemde rol almaktadır (46-48). Farklı karaciğer hasar modellerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (49-55). Deneysel kolit modellerinde melatoninin koruyucu etkileri gösterilmiştir (56-59). Tiyoasetamitle oluşturulmuş karaciğer hasar modellerinde melatoninin koruyucu etkiler gösterdiğini bildiren birçok çalışma vardır (60-62). İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı ve major karaciğer rezeksiyonu modellerinde de melatoninin bakteriyel translokasyonu azalttığı bildirilmiştir (63,64).

Hücreleri serbest radikallerin oluşturduğu hasardan korumak için organizma bazı savunma mekanizmaları geliştirir. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında denge oksidan lehine değişirse oksidatif stres olarak isimlendirilen tablo oluşur (65). Lipidler, oksidatif stresin en çok hedef aldığı hücre komponentidir

(66). Tiyoasetamit asit-reaktif substansları (TBARS) lipid peroksidasyon sürecinin son ürünleridir ve oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılmaktadır (67).

Tiyoasetamit ratlarda FKY modelini oluşturmak için sık kullanılan bir hepatotoksindir (68). TAA ROS artışı ve direkt membran lipitlerinin peroksidasyonuyla doku hasarına neden olur (69,70).

Bu çalışmada Gingko biloba, Vit E ve melatoninin TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde BT üzerine etkileri araştırıldı. BT birçok ciddi klinik tabloda mortalitenin önemli sebebi olan infeksiyon gelişiminde suçlanmaktadır. Bu nedenle antioksidan özellikleri bulunan bu maddelerin BT'u azaltığının gösterilmesi klinikte faydalı olabilir.

Çalışmamızın amaçları

1. Gingko biloba, Vit E ve melatoninin TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde intestinal oksidatif hasar, İBO ve BT üzerine etkilerini araştırmaktı.
2. İntestinal oksidatif stresin BT gelişimindeki rolünü araştırmaktı.
3. İntestinal bakteriyel overgrowth'un BT gelişimindeki rolünü araştırmaktı.

## GENEL BİLGİLER

Fulminan karaciğer yetmezliği, yanık, travma, major cerrahi operasyon, sepsis ve multiorgan yetmezliği gibi sebeplerle yoğun bakımda takip edilen hastalarda infeksiyonlar mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. Bu tablolarda görülen infeksiyon etkenleri genellikle gram negatif bakterilerdir ve hastanın kendi barsak florasından köken almaktadır (1-3).

Klinik pratikte, kritik yoğun bakım hastalarında bakteriyemi, sepsis veya MOYS sıklıkla gözlenmektedir ve bu hastalarda bakteriyemiye yol açacak herhangi bir infeksiyon odağı tespit edilememektedir (4). Goris ve arkadaşları sepsis ve MOYS gelişen bakteriyemili hastaların %34'ünde herhangi bir septik odak bulamadıklarını bildirmişlerdir (5). Bu, barsağın barsak lümeninden kan, mezenter lenf nodları ve ekstraintestinal organlara kaçabilen bakteri ve bakteri ürünleri (endotoksin, ekzotoksin ve hücre duvarı fragmanları) için bir rezervuar olduğu görüşüyle uyumludur. Yoğun bakım hastalarında barsağın sadece hedef organ değil, aynı zamanda bakteriyemi ve sepsis gelişimine katkıda bulunan inflamatuvar mediatörlerin oluşumundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Enterik bakterilerle oluşan infeksiyon riski kardiyopulmoner by-pass, hemorajik şok, intestinal obstrüksiyon, immünsupresif hastalar ve alkolik sirozlu hastalarda yüksektir (4).

Normal şartlarda barsak mukozası lümeninde halihazırda bulunan bakteri ve bakteri ürünlerinin barsak dışına kaçışını önleyen lokal defans bariyeri olarak fonksiyon görür. Bu defans mekanizmasını mikrobiyolojik (mikroorganizmalarla temasın

5

önlenmesi ve kolonizasyona direnç), mekanik (mukus tabakası, peristaltizm ve epitelyal bariyer), immunolojik (immünglobulin sekresyonu, lokal makrofaj sistemi) ve barsakkaraciğer aksı (retiküloendotelyal sistem ve safra tuzları) olmak üzere dört faktör oluşturur (6).

Bakteriyel translokasyon, barsaktan mezenter lenf nodları ve/veya ekstraintestinal alanlara bakteri ve ürünlerinin pasajı olarak tanımlanmaktadır. Toksik nedenler ve major cerrahi operasyonlardan sonra gelişen FKY'de barsaktan artmış BT mevcuttur (7-9). Barsaktan bakteri ve bakteri ürünlerinin barsak dışına translokasyonu aralarında FKY'nin de bulunduğu birçok ciddi klinik tabloda görülen enfeksiyöz komplikasyonları açıklayabilir. Deneysel siroz (10), intestinal iskemi/reperfüzyon (11) ve yanık modellerinde (12) oksidatif stresin intestinal mukozada hasar oluşturarak bakteriyel translokasyonun gelişiminde önemli rol oynadığı ileri süren birçok çalışma vardır.

Yanık, cerrahi stres ve MOYS gibi klinik tablolarda ortak özellik intestinal hipoperfüzyondur. İntestinal hipoperfüzyon barsakta ROS'lerin üretimini artırmaktadır. Artan ROS nitrik oksit üretimini artırmakta, direkt lipid peroksidasyonuna ve barsak duvarında lökosit infiltrasyonuna yol açan proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. Tüm bu etkiler barsakta hasar oluşturarak intestinal bariyer disfonksiyonuna neden olmaktadır (4,13-15).

İntestinal hipoperfüzyon ve hipoksiye sekonder olarak gelişen intestinal mukozal oksidatif hasarın intestinal bariyeri bozarak bakteriyel translokasyona katkıda bulunduğu siroz gibi birçok deneysel portal hipertansiyon modelinde gösterilmiştir (10,16,17). Barsakta artmış oksidatif stresin bir diğer sonucu intestinal motilite üzerine olan olumsuz etkileridir. İntestinal motilideki bozulmanın sirozda artmış bakteriyel translokasyonda önemli rol oynayan İBO'ya neden olduğu gösterilmiştir (10). Antioksidanların BT'ı azalttığı gösterilmiştir (9-11). İntestinal inflamasyon ve hasarda rol oynayan bir diğer faktör PAF'dır. Karaciğer ve barsak dokusundaki çalışmalarda PAF'ın inflamasyon ve doku hasarında önemli bir mediatör olduğu ve bu inflamasyonun PAF antagonistleriyle azaltılabileceği gösterilmiştir (18,19). Akut pankreatit ve intestinal iskemi/reperfüzyon modellerinde PAF antagonistlerinin intestinal bariyer disfonksiyonunu önleyerek BT'ı azalttığı gösterilmiştir (20,21). GB geleneksel Çin tıbbında kullanılan bitkisel bir ekstraktır. Antioksidan ve PAF antagonistik etkilere sahiptir ve iyi tolere edilmektedir. Demans, makula dejenerasyonu ve tinnitus gibi nörolojik sorunların tedavisinde endikedir (22-24). GB

6  
%24 oranında flavonoid ve %6 oranında terpenoid (gingkoloid ve bilobalid) içermektedir. Flavonoid içeriği lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı koruyucu fonksiyonu görmekte (25), terpenoid içeriği ise PAF antagonist etkisiyle (24) ilişkilidir. Antioksidan etkisiyle birçok dokuda GB'nin doku hasarını azalttığı bildirilmiştir (25-30). Ayrıca farklı hepatotoksisite modellerinde lipid peroksidasyonunu azaltarak karaciğer hasarını düzelttiği bildirilmektedir (31-33). Ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyon (34) ve düodenal ülser (35) modellerinde intestinal oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir.

Vitamin E her biri kromanol halkaya eklenmiş bir alifatik yan zinciri olan sekiz molekül içeren bir gruba verilen isimdir. Yan zincirinin doymuş ve doymamış olması temeline göre tokoferol ve tokotrienol olmak üzere 2 gruba ayrılır. Her grup içinde kromanol halkasının 5, 7 ve 8.pozisyonlarındaki spesifik metil grubunun yerleşmesine göre isimlendirilen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olmak üzere 4 form bulunur. Vit E preparatlarındaki hakim form  $\alpha$ -izoformu (Alfa - tokoferol) dur. AT, ROS ve RNS'lerinin çok güçlü bir scavengeri (süpürücüsü) olarak fonksiyon görür (36). Vit E'nin özellikle  $\alpha$  formu IL 1-6 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinleri, endotele monosit adezyonunu, C-reaktif protein düzeylerini, PGE<sub>2</sub> sentezini ve trombosit agregasyonunu azaltarak inflamasyonu önler (37). Vit E'nin ratlarda trinitrobenzenesulfonik asit ile oluşturulmuş kolit modelinde inflamasyonla birlikte olan oksidatif stresten kolonu koruduğu saptanmıştır (38). Vit E suplementasyonunun demir replasmanı sırasında gastrointestinal sistemde meydana gelen oksidatif hasarı azalttığı gözlenmiştir (39). Vit E radyasyon ile oluşturulan intestinal hasar modelinde intestinal oksidatif parametreleri ve histolojiyi düzelttiği gösterilmiştir (40). Vit E'nin ileal poşit modelinde de intestinal oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (41). İntestinal iskemi/reperfüzyon modelinde Vit E + Vit C + allopurinol kombinasyonu intestin TBARS düzeylerini ve histolojiyi düzelttiği gösterilmiştir (42). Vit E'nin TAA ile oluşturulmuş hepatotoksisite modellerinde karaciğerde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (43,44). Vit E'nin ratlarda intestinal obstrüksiyon modelinde intestinal mukozada protektif etki gösterdiği ve BT'ı istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde azalttığı bildirilmiştir (45). Kronik ve portal hipertansif ve koledoku bağlanmış ratlarda Vit E ve vit C kombinasyonunun ileal mukozal lipid peroksidasyonu ve BT'ı azalttığı bildirilmiştir (16).

Melatonin pineal bez ve diğer organlarda sentezlenen ve vücutta birçok fizyolojik, immünolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahip bir hormondur (46). Triptofandan sentezlenir ve sirkadyan ritm fizyolojisinde önemli rol oynar (47). Serbest

7

radikalleri direkt scavenger etkisinin yanı sıra glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri aktive etmek suretiyle indirekt antioksidan aktiviteye sahiptir (46). Ayrıca nitrik oksit sentaz ve lipoksijenaz gibi prooksidan enzimlerin sentezini azaltarak antioksidan etkiler gösterir (48). Melatonin değişik karaciğer hasar modellerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (49-55). Deneysel kolit modellerinde melatoninin koruyucu etkileri gösterilmiştir (56-59). Tiyoasetamitle oluşturulmuş karaciğer hasar modellerinde melatoninin koruyucu etkiler gösterdiğini bildiren birçok çalışma vardır (43,49,60-62). İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı (63) ve major karaciğer rezeksiyonu modellerinde (64) melatoninin bakteriyel translokasyonu azalttığı bildirilmiştir.

Normal metabolizma sırasında oksijenin kullanımı hücre ve dokulara çok toksik etki gösterebilen ROS oluşumuna neden olur. Oluşan bu radikallerden hücre ve dokulara en çok hasar veren, hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil (-OH) radikalidir. Serbest radikaller ve -OH radikali canlı hücredeki her molekül (lipitler, aminoasitler, nükleotidler, şekerler) ile reaksiyona girer ve sonuçta kanser, nörodejenerasyon ve otoimmün hastalıklar gibi tablolara yol açan hasara neden olur. Hücreleri serbest radikallerin oluşturduğu hasardan korumak ve hücre içinden ROS'u hızlı bir şekilde elimine etmek için organizma bazı savunma mekanizmaları geliştirir. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında denge oksidan lehine değişirse oksidatif stres olarak isimlendirilen tablo oluşur. Direktt ortadan kaldırılamayan veya metabolize edilemeyen oksidan maddeler hücre komponentlerine zarar vererek hücre ölümüne dek gidebilen olaylara neden olabilir (65). Lipidler, oksidatif stresin en çok hedef aldığı hücre komponentidir. Lipid oksidasyonu sonucunda birçok sekonder ürün ortaya çıkar (66). Bu sekonder ürünlerin serum ve dokularda ölçülmesi, oksidatif stres varlığı ve derecesini araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. TBARS lipid peroksidasyon sürecinin son ürünleridir ve oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılmaktadır (67). Çalışmamızda oksidatif stresin düzeyini değerlendirmek için serum, karaciğer ve barsak dokusunda TBARS düzeyleri ölçüldü.

Tiyoasetamit ratlarda FKY modelini oluşturmak için sık kullanılan bir hepatotoksindir (68). TAA ROS artışı ve bunun sonucunda gelişen direkt membran lipitlerinin peroksidasyonu doku hasarına neden olur (69,70).

Şimdiye kadar, TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde GB, Vit E ve melatoninin BT üzerine etkileriyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın

8

amacı GB, melatonin ve Vit E'nin TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde BT ve intestinal oksidatif hasar üzerine etkilerini araştırmaktır.

9

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **1. Çalışmanın Hipotezleri:**

1. Ratlarda fulminan karaciğer yetmezlik modelinde antioksidan etkileri olan GB, Vit E ve melatoninin intestinal oksidatif hasar ve BT üzerindeki etkileri
2. BT gelişiminde oksidatif stres ve İBO'un rolünün araştırılması.

## **2. Araştırmanın Tipi:**

Araştırma ratlarda yapılan deneysel bir çalışmadır.

## **3. Araştırmanın İnsan Gücü:**

Bu çalışmanın deney aşamasında İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. M. M. Murat Harputluoğlu ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Doğu Karahan, biyokimyasal incelemelerde Fatma Özyalın ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. İsmail Temel, histolojik incelemelerde Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Neşe Karadağ, mikrobiyolojik incelemelerde Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Mehmet Bayraktar görev almıştır.

## **4. Hayvanlar**

Çalışmada 200-250 g ağırlığında sağlıklı erkek Wistar ratlar kullanıldı.

Hayvanlar 12 saatlik aydınlık/karanlık sikluslar ve  $24 \pm 1$  °C'de sabit ısısı olan ortamda, 10

su ve rat yemine ulaşabilecekleri kafeslerde barındırıldı. Çalışma protokolü hayvan araştırmaları kılavuzlarına uygundu ve hastanemiz etik kurulu tarafından onaylandı.

## **5. Fulminan karaciğer yetmezliğinin oluşturulması**

Fulminan karaciğer yetmezliği daha önce tanımlandığı gibi 3 gün boyunca 350 mg/kg/gün intraperitoneal tiyoasetamid (Merck, Germany) verilerek oluşturuldu (62). Kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden kaçınmak için potasyum(20 mEq/l) içeren %0.9 NaCl ve %5 dekstroz solüsyonu 25 ml/kg dozunda 6 saat arayla destekleyici tedavi olarak subkütan verildi (62).

## **6. Deneyin tasarımı**

Toplam 42 erkek Wistar rat 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (n=8) kontrol grubuydu. Bu gruba 5 gün boyunca intraperitoneal 0,1 ml/gün % 0.9 NaCl verildi. Grup 2 (n=10) TAA grubuydu. Bu gruptaki ratlara 24 saatlik periyodlarla 3 gün boyunca intraperitoneal 350 mg/kg TAA verildi. Grup 3(n=8) TAA+GB grubuydu. Bu gruba ilk TAA dozundan 2 gün önce 100 mg/kg kuru toz halindeki GB (TriPharma Drug Company, Türkiye) ekstraktı sulandırılarak oral başlandı ve 5 gün devam edildi. GB dozu ve süresi GB ile ilgili daha önce yapılan çalışmalara göre belirlendi(30, 25). Grup 4(n=8) TAA+ Vit E grubuydu. Bu gruba ilk TAA dozundan 2 gün önce 24 saat arayla 200 mg/kg Vit E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate; Sigma Chemicals) oral başlandı ve 5 gün boyunca devam edildi (44). Grup5 (n=8) TAA+Melatonin grubuydu. Bu gruba ilk TAA dozundan 2 gün önce 3 mg/kg Melatonin® (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) %5 etanol ve serum fizyolojik ile çözüldükten sonra intraperitoneal verildi ve 5 gün boyunca devam edildi (61,62).

## **7. Örneklerin alınması**

Çalışmanın 6. gününde 50 mg/kg Ketamin (Ketolar, Parke-Davis) ve Xylazine HCl (10 mg/kg; Alfazyne %2 Alfasan, Netherland) ile anestezi yapıldı. Deri traş edilip ve iodeine ile temizlendikten sonra sıkı steril şartlar altında laparotomi yapıldı. Abdomen genişçe açıldı. İleoçekal bölge mezenter lenf nodları ve dalak aseptik olarak disseke edildi, alındı, tartıldı ve bakteriyel kültür için steril saline konuldu. Karaciğer aseptik olarak disseke edildi ve sol lob bakteriyel kültürler için kullanıldı. Karaciğer sağ lobu histopatolojik ve biyokimyasal ölçümler için eksize edildi. İntestinal bakteriyel aşırı çoğalmayı değerlendirmek için steril enjektörle 0,1 ml ileal sıvı aspire edildi ve uygun 11

vasatlara ekim yapıldı. Amonyak, aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve TBARS ölçümleri için sağ ventrikülden kan alındı. İleum histopatolojik ve



biyokimyasal ölçümler için alındı.

### **8. Karaciğer ve barsak histolojisi**

Karaciğerin histopatolojik incelemeleri için sağ loblarının yarısı ışık mikroskopunda değerlendirilmek üzere işlendi. Bu işlem için alınan sağ loblar %5 nötral formol solüsyonunda fikse edildi. Parafin içine gömüldü, 5 µm kalınlığında dilimlendi ve hematoksilin-eosin ile boyandı. Doku preparatları örneklerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen iki deneyimli patolog tarafından incelendi ve skorlandı. Nekroz ve inflamasyonun derecesi her preparatın 10 farklı alanındaki bulguların 0-3 (0:normal, 1:hafif, 2:orta, 3: şiddetli) arası sınıflandırılmış bir skala ile değerlendirilip ortalamaları olarak ifade edildi (71).

İleum örnekleri 24 saat boyunca %5 nötral formol içinde fikse edildi. Barsak segmentleri 0,5 x 0,5 x 0,5 cm'lik parçalara bölündü ve inceleme için işlendi. Her hayvanın incelenen barsak doku örnekleri farklı bloklardan elde edildi. Her doku örneğinden alınan 6-7 mm uzunluğundaki doku parçaları ışık mikroskopunda incelendi. İntestinal histopatolojik inceleme için 0(hafif)'dan 3(şiddetli)'e değişen skorlama sistemi kullanıldı. Mukozal bütünlük, ödem, lamina propriada inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve damarlardaki vazodilatasyonun şiddetine göre skorlama yapıldı (64).

### **9. Biyokimyasal analizler**

#### **a. Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması**

Her rattan yaklaşık 4 ml kan alındı. Her kan örneğinin 1 ml'si direkt deproteinizasyon işlemi amacıyla 1 ml %10 trikarboksilik asit (TCA) içeren santrifüj tüplerine nakledildi ve karıştırma işleminin takiben 10 dakika 3000 devirde santrifüje edildi. Daha sonra tüpün üstündeki temiz süpernatant amonyak analizi için kullanıldı. Geriye kalan 3 ml kan örnekleri daha önce işaretlenmiş boş santrifüj tüplerine serumlarının ayrılması için nakledildi. Bu örnekler oda ısısında yarım saat bekletildi ve 10 dakika 3000 devirde santrifüje edildi. Bu yolla elde edilen serum örnekleri biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere analiz gününe kadar -20 °C'de depolandı. Sakrifikasyonu takiben alınan karaciğer ve ileum dokuları 3 kez soğuk %0.9 NaCl solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tartıldı ve yaş ağırlıkları kaydedildi. Dokular kabaca 0,5-1 gramlık parçalara ayrıldı, alüminyum folyolara sarılarak daha önce işaretlenmiş 12

kapaklı plastik kaplara yerleştirilerek analiz gününe kadar derin dondurucuda (-20 °C'de) saklandı. Analiz günü örnekler derin dondurucudan çıkarıldı, uygun ısıda çözündükten sonra tartıldı ve örneklerin ağırlığının 10 katı ağırlığında soğuk KCL (150mM) eklendikten sonra 2 dakika 5000 r/min cam-teflon homojenizatör (Tempest Virtishear, Model 278069;The Virtis, Gardiner, NY)'de homojenize edildi. Homojenatlar aynı gün TBARS ölçümü için kullanıldı.

#### **b. Kan amonyak analizi**

Kan amonyak düzeyleri kolorimetrik Berthelot (indophenol) reaksiyonu(73) kullanılarak ölçüldü. Bu reaksiyonda örneklerdeki daha önce deproteinize edilen serbest amonyak içinde fenol ve hipoklorid bulunan alkali ortamda TBARS sodyum nitroprusside ile reaksiyona girerek mavi renkli indofenol molekülü oluşturur. Kromojenin spektrofotometrede 625 nm dalgaboyunda koyu renkli örneklere karşı ölçülen absorbansı direkt olarak amonyağın konsantrasyonuyla orantılı olarak artar. Deneyin sonuçları içinde standart şekilde (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılan µg amonyak nitrojen/dl olarak ifade edildi.

#### **c. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi**

Oksidatif stresin göstergesi olan TBARS ve diğer lipid peroksidasyon ürünlerinin analizi Buege ve Aust tarafından 1978’de tanımlanan TBARS metoduna göre yapıldı (73). Kısaca, 250 µl doku ve serum homojenatı, 500 µl TBA reaktifi (0,25 mol/l HCl asid içinde çözülmüş 3,7 g/l tiyobarbitürik asid) ve %15 TCA’ın 1,5 ml’si yaklaşık 10 ml lik vida kapaklı pyreks santrifüj tüplerine eklendi, karıştırıldı ve sonra tüpler 95 °C’deki sıcak su banyosuna yerleştirildi. Tüpler 30 dakika sıcak su banyosunda bekletildi ve sonra hızlıca suda soğutuldu. Tüplere 3 ml n-butanol eklendi ve karıştırıldı ve pembe renkli ajan butanol faza geçebildi. Renkli organik faz absorbanı spektrofotometrede 535 nm de koyu renge karşı okundu. Serum ve doku TBARS düzeyleri içinde kalibratör olarak 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMOP) kullanılan farklı TMOP konsantrasyon diyagramları kullanılarak belirlendi. Serum düzeyleri nmol/l ve doku düzeyleri nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

#### **d. Serum AST, ALT düzeyleri**

Serum AST ve ALT düzeyleri International Federation of Clinical Chemistry tarafından tanımlanan ve piridoksal fosfat ve NADH’ın kofaktör olarak kullanıldığı 13

kinetik UV metodu kullanılarak ölçüldü. Her iki analiz için Turgut Özal Tıp Merkezi’nin rutin Biyokimya Laboratuvarlarında kullanılan Olympus auto-analyzer ve aynı firmanın ticari kitleri kullanıldı. AST ve ALT düzeyleri Ünite/L olarak ifade edildi

### **10. Mikrobiyolojik çalışmalar**

#### **a. Bakteriye translokasyon**

Bakteriyel translokasyon mezenterik lenf nodları, karaciğer ya da dalak kültürlerinin pozitifliği olarak tanımlanır. Her gruptan 1 gr örnek (karaciğer, dalak, mezenterik lenf nodları) 1 ml steril normal salinde homojenize edildi. 100 µl aspire edildi ve Kanlı agar, Eosin Methylene Blue (EMB) agar ve Sabouraud agar’a ekildi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Takib eden gün bakteriyel çoğalma kontrol edildi ve koloni sayımı yapıldı. Her koloni için gram boyama yapıldı. Gram boyama sonuçlarına göre katalaz, oksidaz, koagülaz, indol, sitrat indirgenme, üreaz, üçlü şeker demir agarda şeker fermentasyonu gibi spesifik biyokimyasal testler primer olarak izole edilen bakterilerin tanımlanması için uygulandı. Api 20 E test (bio-Merieux, Marcy L’Etoile, France) bakteri tanımlanmasının doğrulanması için kullanıldı. Mantar çoğalması için Remel Rapid™ Yeast plus System 8311007 (Remel Inc. 12076 Santa Fe dr. Lenex KS 66215 USA) kullanıldı

#### **b. İntestinal Bakteriye Overgrowth (İBO)’un değerlendirilmesi**

Spesifik bir organizmanın İBO’u, normal rat ileal aspiratındaki aynı organizmanın üreyen sayısının ortalaması artı + 2 standart sapmanın üstündeki değerler olarak tanımlanmaktadır. İleum aspiratının 0,1 ml’si Kanlı agar, EMB agar, Sabouraud agara ekildi ve 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Takib eden gün bakteriyel çoğalma kontrol edildi ve koloni sayımı yapıldı. İleal aspirat koloni sayısı x10<sup>3</sup> colony-forming units (CFU)/ml olarak belirtildi(74).

### **11. Survi oranları**

İlk TAA dozundan sonra gruplardaki mortalite sayısı günlük kaydedildi. Sonuçlar sakrifikasyon günü tüm gruplardaki yaşayan rat sayısına göre belirlendi.

14

### **12. İstatistik**

Sonuçlar ortalama ± Standart Deviasyon olarak ifade edildi. Analizler SPSS 11.0 istatistik programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki kantitatif değişkenlerin

karşılaştırılması one-way ANOVA veya gerektiğinde onun karşılığı olan nonparametrik (Kruskal-Wallis) testi ile yapıldı. Post-hoc karşılaştırma LSD test ile yapıldı. Oran karşılaştırmaları  $\chi^2$  veya Fisher test kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalarda  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel anlamlı kabul edildi.

15

## **BULGULAR**

### **1. Mortalite ve survi oranları**

TAA, TAA+GB ve TAA+Vit E gruplarında survi oranı kontrol grubundan düşüktü ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). TAA+Mel grubunda survi oranı TAA grubundan yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ).

Tablo 1. Sakrifikasyon günü grupların mortalite sayısı ve survi oranları (%)

Grup Mortalite sayısı Survî oranları %

Kontrol (n=8) 0/8 100

TAA (n=10) 1/10 90

TAA+GB (n=8) 1/8 87,5

TAA+Vit E (n=8) 1/8 87,5

TAA+ Mel (n=8) 0/8 100

16

### **2. Karaciğer enzimleri**

Grupların serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıydı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $< 0.001$  ve  $< 0.001$ ) (Tablo 2). TAA grubundaki serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $< 0.001$  ve  $< 0.001$ ). TAA+GB grubunda serum amonyak (Figür 1), AST ve ALT düzeyleri TAA grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (sırasıyla,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ). TAA+Vit E ve TAA+Mel gruplarında serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri ile TAA grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

Tablo 2. Gruplara göre serum amonyak, AST ve ALT düzeylerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri.

<sup>1</sup>Amonyak (g amonyak nitrojen/dl olarak belirtildi.

<sup>2</sup>AST ve ALT Units/l olarak belirtildi.

<sup>a</sup> kontrol grubuyla karşılaştırıldığında  $p < 0.001$

<sup>b</sup> TAA grubuyla karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ .

Grup Amonyak<sup>1</sup> AST<sup>2</sup> ALT<sup>2</sup>

Kontrol (n=8) 21,75 $\pm$ 6,02 150,75 $\pm$ 40,93 58,00 $\pm$ 12,05

TAA (n=9) 145,22 $\pm$ 14,49<sup>a</sup> 1767,44 $\pm$ 174,91<sup>a</sup> 1165,67 $\pm$ 167,40<sup>a</sup>

TAA+GB (n=7) 87,57 $\pm$ 12,03<sup>b</sup> 1018,57 $\pm$ 201,81<sup>b</sup> 687,00 $\pm$ 153,48<sup>b</sup>

TAA+ Vit E (n=7) 137,29 $\pm$ 15,83 1602,71 $\pm$ 295,73 1065,86 $\pm$ 60,42

TAA+Mel (n=8) 135,13 $\pm$ 12,23 1601,88 $\pm$ 227,68 1068,38 $\pm$ 121,36

17

### **3. Oksidatif stres sonuçları**

Serum, karaciğer ve barsak TBARS düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark vardı (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $< 0.001$  ve  $< 0.001$ ) (Tablo 3). TAA grubundaki serum, karaciğer ve barsak TBARS düzeyleri kontrolden anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $< 0.001$  ve  $< 0.001$ ). TAA+GB grubunda serum ve karaciğer TBARS düzeyleri (Figür 2) TAA grubundan anlamlı şekilde düşükken ( $p < 0.001$  ve  $< 0.001$ ), barsak TBARS düzeyi anlamlı değişmedi ( $p > 0.05$ ). TAA+Vit E ve TAA+Mel gruplarındaki

serum, karaciğer ve barsak TBARS düzeyi TAA grubundan anlamlı farklı değildi ( $p>0.05$ ) (Figür 3).

Tablo 3. Gruplara göre serum, karaciğer ve barsak tiyobarbiturik asit-reaktif substansları (TBARS) düzeylerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri.

<sup>1</sup>Serum TBARS düzeyi (sTBARS) nmol/L, <sup>2</sup> karaciğer TBARS düzeyi (kcTBARS) ve barsak TBARS düzeyi (bTBARS) nmol/g yaş doku olarak belirtildi.

<sup>a</sup> kontrol grubuyla karşılaştırıldığında  $p<0.001$ ,

<sup>b</sup> TAA grubuyla karşılaştırıldığında  $p<0.001$ .

Grup sTBARS<sub>1</sub> kcTBARS<sub>2</sub> bTBARS<sub>2</sub>

Kontrol (n=8) 21,00 $\pm$ 3,42 24,75 $\pm$ 4,62 41,38 $\pm$ 9,53

TAA (n=9) 76,56 $\pm$ 19,93<sup>a</sup> 114,78 $\pm$ 18,46<sup>a</sup> 127,33 $\pm$ 16,49<sup>a</sup>

TAA+GB(n=7) 27,00 $\pm$ 2,16 70,43 $\pm$ 7,80 117,86 $\pm$ 11,00

TAA+ Vit E(n=7) 68,71 $\pm$ 7,29 102,29 $\pm$ 9,19 122,86 $\pm$ 11,53

TAA+Mel (n=8) 68,13 $\pm$ 8,70 103,00 $\pm$ 22,67 122,88 $\pm$ 10,42

18

#### 4. İBO ve BT

İleal aspirattaki üreyen *E.coli* sayısı TAA grubunda kontrolden yüksekti ( $p<0.001$ ) (Tablo 4) (Figür 4). Diğer gruplarla TAA arasında ileal aspirattaki üreyen *E.coli* sayısı açısından anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ).

$\chi^2$  testi ile yapılan karşılaştırmada TAA grubunda BT sıklığı kontrolden anlamlı şekilde yüksekti ( $p<0.001$ ). TAA grubunda BT sıklığı TAA+GB'den yüksekti ancak fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). TAA grubu ile Vit E grubu arasında BT sıklığında fark yoktu ( $p>0.05$ ). TAA grubunda BT sıklığı TAA+Mel'den yüksekti ancak fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Tüm gruplarda transloke olan bakterinin *E. Coli* olduğu görüldü.

19

Tablo 4. Gruplara göre ileal aspiratta üreyen *Eschericia coli* sayısı ( $\times 10^3$  CFU/ml olarak) ve bakteriyel translokasyon sıklığı.

Grup *Eschericia coli* sayısı BT sıklığı (%)

Kontrol(n=8) 9,06 $\pm$ 2,52 0 (%0)

TAA (n=9) 177,77 $\pm$ 44,09<sup>a</sup> 9 (%100)<sup>a</sup>

TAA+GB (n=7) 164,28 $\pm$ 47,55 5 (%71.4)

TAA+Vit E (n=7) 171,42 $\pm$ 39,33 7 (%100)

TAA+Mel (n=8) 168,75 $\pm$ 26,42 6 (%75)

<sup>a</sup> kontrol grubuyla karşılaştırıldığında  $p<0.001$ .

20

#### 5. Karaciğer ve barsak histolojisi

TAA grubunda karaciğer nekroz ve inflamasyon skorları kontrolden anlamlı şekilde yüksekti ( $p<0.001$  ve  $<0.001$ ) (Tablo 5). Karaciğer nekroz ve inflamasyon skorları TAA+GB grubunda TAA grubundan anlamlı şekilde düşüktü ( $p<0.001$  ve  $<0.001$ ). TAA+Vit E ve TAA+Mel gruplarında bu skorlar açısından TAA grubu ile karşılaştırıldığında fark yoktu ( $p>0.05$ ). Figür 5 gruplara göre karaciğer histolojisini göstermektedir. Figür 5c'de görüldüğü gibi TAA+GB grubunda karaciğer histolojisinde belirgin düzelme mevcuttu.

Tablo 5. Gruplara göre karaciğer nekroz ve inflamasyon skorlarının ortalama  $\pm$  SD değerleri.

<sup>a</sup>kontrol ile karşılaştırıldığında  $p<0.001$ ,

<sup>b</sup>TAA grubuyla karşılaştırıldığında  $p<0.001$ .

Grup Nekroz İnflamasyon

Kontrol (n=8) 0,00±0,00 0,00±0,00  
TAA (n=9) 2,78±0,44<sub>a</sub> 2,78±0,44<sub>a</sub>  
TAA+GB (n=7) 1,57±0,53<sub>b</sub> 1,57±0,53<sub>b</sub>  
TAA+ Vit E (n=7) 2,43±0,53 2,29±0,48  
TAA+Mel (n=8) 2,50±0,53 2,38±0,51

21

Figür 5. Kontrol grubu (a), TAA grubu (b), TAA+GB grubu (c), TAA+ Vit E grubu (d) ve TAA+ melatonin (e) grubunda karaciğer histolojisi.

Barsağın histolojik incelemesinde; mukozal ünite, ödem, lamina propriada inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve damarlarda vazodilatasyon skorları TAA grubunda kontrol grubundan anlamlı şekilde yükseldi sırasıyla  $p<0.001$ ,  $<0.001$  ve  $<0.001$ ) (Tablo 6). Diğer gruplarla TAA grubu arasında bu skorlar açısından anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Figür 6 gruplara göre barsak histolojisini göstermektedir.

22

Tablo 6. Gruplara göre barsak mukozal ünite, ödem, lamina propriada inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vazodilatasyon skorlarının ortalama  $\pm$  SD değerleri.

MU: Mukozal ünite, İNF: Lamina propriada inflamatuvar hücre infiltrasyonu,

VD: damarlardaki vazodilatasyon.

<sub>a</sub> kontrol grubuyla karşılaştırıldığında  $p<0.001$ .

Figür 6. Kontrol grubu (a), TAA grubu (b), TAA+GB grubu (c), TAA+ Vit E grubu (d) ve TAA+ melatonin (e) grubunda barsak histolojisi.

Grup MU Ödem İNF VD

Kontrol (n=8) 0,00±0,00 0,00±0,00 0,00±0,00 0,00±0,00  
TAA (n=9) 2,67±0,50<sub>a</sub> 2,89±0,33<sub>a</sub> 2,89±0,33<sub>a</sub> 2,67±0,50<sub>a</sub>  
TAA+GB (n=7) 2,57±0,53 2,57±0,53 2,71±0,48 2,43±0,78  
TAA+ Vit E (n=7) 2,43±0,53 2,86±0,37 2,71±0,48 2,29±0,48  
TAA+Mel (n=8) 2,50±0,53 2,75±0,46 2,75±0,46 2,38±0,51

23

## TARTIŞMA

Çalışmamızda karaciğer yetmezliği 3 gün 350 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal TAA verilmesiyle başarıyla oluşturuldu. TAA grubunda karaciğer ve barsakta yüksek TBARS düzeyleriyle kendini gösteren ciddi oksidatif doku hasarı vardı. Buna yüksek BT oranları eşlik ediyordu. GB verilmesi karaciğerde histolojik ve biyokimyasal parametreleri anlamlı şekilde düzeltti. Barsakta histolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine ne GB ne Vit E ne de melatonin düzelme sağlamadı. Her üç grupta da şiddetli intestinal oksidatif hasara TAA grubunda olduğu gibi yüksek bakteriyel translokasyon oranları eşlik etmekteydi.

Sağlıklı kişilerde normalde barsak kökenli bakteriyemi ve sepsis görülmez.

Çünkü konak barsakta bakteri ve ürünlerinin barsak dışı dokulara yayılmasını önlemek için birçok defans mekanizması geliştirmektedir. Normal koşullar altında intestinal mukoza intestinal lümendeki bakteri ve bakteri ürünlerinin lümen dışına çıkmasını önlemek üzere lokal defans bariyeri olarak fonksiyon görmektedir. Ancak bazı deneysel ve klinik durumlarda bu intestinal bariyer fonksiyonu bozulur ve sonuçta bakteri ve bakteri ürünleri mezenterik lenf nodları ve sistemik dokulara geçer. Bu süreç bakteriyel translokasyon olarak tanımlanır (6). Yanık, cerrahi stres, sepsis ve multiorgan yetmezlik gibi ciddi klinik tablolarda normal intestinal bariyer fonksiyonunun bozulduğu ve bakterilerin barsaktan barsak dışı bölgelere geçtiği bildirilmiştir (6,13-15). İntestinal bariyer fonksiyonunun bozulmasında mukozal hipoksi, oksidatif stres,

mukozal asidoz, ATP azalması, nitrik oksit ve sitokinler suçlanmaktadır (75).

24

Normal metabolizma sırasında oksijenin kullanımı hücre ve dokulara çok toksik etki gösterebilen ROS oluşumuna neden olur. ROS canlı hücredeki her molekül (lipitler, aminoasitler, nükleotidler, şekerler) ile reaksiyona girer. Hücreleri ROS'un oluşturduğu hasardan korumak ve hücre içinden ROS'u hızlı bir şekilde elimine etmek için organizma bazı savunma mekanizmaları geliştirir. ROS ve antioksidan savunma sistemleri arasında denge ROS lehine değişirse oksidatif stres olarak isimlendirilen tablo oluşur (65). Artan ROS nitrik oksit (NO) üretimini artırır, direkt lipit peroksidasyonuna ve barsakta lökosit infiltrasyonuna yol açan birçok proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur (4). Oksidatif stres sodyum-hidrojen iyon değişimi gibi önemli hücresel süreçleri inhibe ederek hücresel homeostazisi bozar. Ayrıca ATP'nin hücre içi düzeylerini azaltarak hücresel mitokondrial fonksiyonları bozar (76-79). Bütün bu etkiler sonuçta barsakta hasar oluşturarak barsak epitelinin permeabilitesini artırır ve intestinal bariyer disfonksiyonuna neden olur. Çalışmamızda TAA verilmesiyle şiddetli intestinal mukozal oksidatif hasar gelişti. TAA grubunda yüksek BT oranlarının görülmesi, BT sürecinde intestinal oksidatif hasarın önemli rol oynadığını bildiren daha önceki çalışmalarla uyumludur (10,12).

Bu çalışmada 100 mg/kg/gün dozunda GB verilmesi TAA grubuyla karşılaştırıldığında BT sıklığını %100'den %71.4'e düşürdü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Vit E ve melatonin tedavilerinin aksine GB tedavisiyle karaciğerde morfolojik bulgulara belirgin düzelme (Figür 5a) ve oksidatif strese anlamlı azalma gözlemlendi. Ancak bu olumlu etkileri barsakta göstermedi. GB flavone glikozit ve terpenoidleri içerdiğinden dolayı antioksidan ve PAF antagonistik etkilere sahip iyi tolere edilen bitkisel bir maddedir (80). Karaciğer, barsak, beyin ve pankreas gibi birçok dokuda antioksidan özelliğiyle oksidatif doku hasarını önlediği bildirilmiştir (26,30,31,34). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda da GB verilmesiyle TAA ile oluşturulan FKY'de karaciğer hasarının ve karaciğer TBARS yüksekliğinin anlamlı azalması GB'nin hepatoprotektif etkisinde antioksidan etkisinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışmada GB'nin seçilmesinin en önemli sebebi antioksidan özelliğine ilave olarak PAF antagonist etkiye sahip olmasıydı. Gerçekten PAF kemotaksi, agregasyon, süperoksit salınımı ve degranülasyona yol açarak nötrofil aktivasyonunu sağlayan bir mediatördür ve akut inflamasyonda hayati bir rol oynamaktadır (81).

PAF ayrıca major hepatektomi sonrası akut karaciğer hasarı, siroz, letal hepatit, intestinal inflamasyon ve karaciğerin iskemi/reperfüzyon hasarında da rol oynar (82).

25

Karaciğerde PAF antagonistlerinin doku hasarını önlediği gösterilmiştir (83). Bu çalışmada karaciğer yetmezliği oluşturmak için kullanılan TAA, ROS artışı ve bunun sonucunda gelişen direkt membran lipitlerinin peroksidasyonuyla doku hasarına neden olur (69,70). Ancak TAA hepatotoksitesinde dokuya eozinofil ve mononükleer hücre infiltrasyonu sonucu ileri derecede artmış myeloperoksidaz aktivitesi sonrasında oluşan ROS ve RNS'lerinin de doku hasarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (49).

Çalışmamızda GB'nin PAF antagonistik etkisinin düzeyini direkt değerlendirecek herhangi bir parametre kullanılmadı. Bununla birlikte diğer iki antioksidan maddenin aksine GB grubunda karaciğerde azalmış oksidatif stresle birlikte inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalması gözlemlendi. Bu bulgu, GB'nin hepatoprotektif etkisinde

antioksidan aktivitesine ek olarak PAF antagonistik etkisinin önemli katkı sağladığını düşündürmektedir.

Antioksidan ve PAF antagonistlerinin barsakta doku hasarını azalttığını bildiren çalışmalar olmasına rağmen (84) GB uygulanan dozda karaciğerin aksine barsakta oksidatif doku hasarını önleyemedi. Daha önce karaciğer, beyin, mide ve myokard dokusunda yapılan çalışmalarda GB'nin protektif etkilerini doz bağımlı şekilde gösterdiği bildirilmiştir (85-88). GB'nin barsaktaki oksidatif hasarı önleyememesinin sebebi bu çalışmalarda olduğu gibi antioksidan etkisini doz bağımlı şekilde göstermesine bağlı olabilir. Obstrüktif sarılık, pankreatit, intestinal iskemi/reperfüzyon modellerinde PAF antagonistlerinin BT'ı azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen, karaciğer yetmezlik modelinde PAF antagonistlerinin BT üzerine etkisiyle ilgili yayın bulunmamaktadır (20,21,89,90). GB'nin BT sıklığını azaltamamasının sebebi uygulanan dozda intestinal oksidatif hasarın azalmamasına bağlı düşünüldü.

Çalışmamızda TAA öncesi 200 mg/kg/gün oral Vit E verilmesi bakteriyel translokasyonu azaltmadı. Bunun en önemli sebebi bu grupta barsakta oksidatif hasarın anlamlı şekilde önlenememesi olabilir. Vitamin E serbest radikalleri süpürebilen, membran bütünlüğünü koruyabilen ve yağda eriyen antioksidan bir maddedir. Lipid peroksidasyon ürünlerini azaltarak hücreleri ve hücre yapıları oksidatif strese korur (36). Vit E'nin antioksidan özelliğiyle birçok deneysel modelde barsak (38,39) dokusunda gelişen oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir. Vit E'nin ratlarda intestinal obstrüksiyon modelinde intestinal mukozada protektif etki gösterdiği ve BT'ı istatistiksel anlamlı olmayacak şekilde azalttığı bildirilmiştir (45). Kronik ve portal hipertansif ve koledokü bağlanmış ratlarda Vit E ve vit C kombinasyonunun ileal mukozal lipid peroksidasyonu ve BT'ı azalttığı bildirilmiştir (16). TAA ile oluşturulmuş karaciğer

26 yetmezlik modelinde Vit E'nin intestinal oksidatif hasar ve BT üzerine etkileriyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ancak Tunez ve ark. (150 mg/kg tek dozda TAA ve 200 mg/kg Vit E), Sarkar ve ark. (150 mg/kg tek dozda TAA ve 200 mg/kg Vit E) ve Shin ve ark. (200 mg/kg tek dozda TAA ve 200 mg/kg Vit E) oluşturdukları hepatotoksisite modellerinde Vit E'nin karaciğerde oksidatif hasarı azalttığını bildirdi. Çalışmamızda 3 gün 350 mg/kg/gün dozunda TAA verilmesiyle oluşturulan karaciğer yetmezliği modelinde 200 mg/kg Vit E tedavisi ne karaciğerde ne de barsakta oksidatif hasarı önleyemedi. Vit E'nin karaciğer ve barsaktaki yetersiz koruyucu etkisini verilen TAA dozunun fazla olması açıklayabilir. Vitamin E'nin antioksidan etkisiyle birçok deneysel modelde karaciğer dokusunda gelişen oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (91,92). Tiyoasetamitle oluşturulmuş hepatotoksisite modellerinde Vit E'nin karaciğerde histolojiyi ve oksidatif parametreleri düzelttiği gösterilmesine rağmen bizim modelimizde etki etmemesi kullandığımız TAA dozuyla ilişkili olabilir. Biz bu çalışmada 3 gün 350 mg/kg/gün dozunda kullandık. Bu diğer modellerden daha fazla toksisite oluşturmuş olabilir ve Vit E relatif olarak yeterli antioksidan etkinlik göstermemiş olabilir.

Çalışmamızda TAA öncesi melatonin verilmesi bakteriyel translokasyonu sıklığını azaltmadı. Bu grupta Vit E grubunda olduğu gibi yüksek BT oranlarına karaciğer ve barsakta şiddetli oksidatif doku hasarı eşlik ediyordu. Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamine) pineal bezin ana sekretuar ürünlerinden birisidir ve vücutta birçok organda üretilerek salındığı bilinmektedir (93). Serbest radikal scavengeri olarak direkt ve birçok antioksidan enzimi aktive ederek indirekt

antioksidan etkilere sahiptir. Küçük boyutu ve yüksek lipofilik özelliğinden dolayı biyolojik bariyerleri kolayca geçer hücrenin bütün komponentlerine ulaşır (94). Birçok çalışmada karaciğer (49-55) dokusunda oksidatif hasarı antioksidan özelliğiyle önlediği bildirilmiştir. Tunez ve arkadaşları yaptıkları iki ayrı çalışmada TAA ile oluşturulan karaciğer yetmezliğinde melatonin (3 mg/kg) verilmesinin oksidatif stresi ve hepatik hasarı önlediğini bildirdi (61,95). Cruz ve arkadaşları TAA vererek oluşturdukları deneysel karaciğer siroz modelinde melatonin (1 mg/kg) tedavisiyle oksidatif stres, hücre hasarı ve karaciğer fibrozisinin azaldığını bildirmiştir (60). Bruck ve arkadaşları ratlarda TAA ile oluşturulan karaciğer hasar modelinde melatonin (3 mg/kg/gün) tedavisiyle nuclear factor kappa B aktivasyonunu inhibe ederek oksidatif stresi ve karaciğer hasarını azalttığı ve surviyi düzelttiğini göstermiştir (62). Yukarıda bahsedildiği gibi tiyoasetamit ve diğer hepatotoksisite modellerinde melatoninin

27

oksidatif stresi ve hepatik hasarı mükemmel bir şekilde önlediği bildirilmesine rağmen, Karabay ve arkadaşları TAA (2 gün 200 mg/kg/gün) ile oluşturdukları karaciğer hasar modelinde 10 mg/kg/gün dozunda melatonin tedavisinin oksidatif stres parametrelerini (hepatik malondialdehit ve indirgenmiş glutatyon düzeyleri ve hepatik katalaz aktivitesi) değiştirmedeğini ve karaciğer hasarını önleyemediğini bildirmiştir. Melatoninin lipid peroksidasyonunu engelleyememesinin sebebini melatoninin ROS ve RNS ürünlerini doz bağımlı şekilde scavenge etmesine ve uyguladıkları dozda dokuda biriken inflamatuvar hücrelerce ROS ve RNS ürünlerinin aşırı üretilmesine bağlı olabileceğini bildirdiler. Ayrıca reaktif TAA ürünlerinin de bu hasara katkıda bulunmuş olabileceğini bildirdiler (49). Bizim çalışmamızda da melatonin tedavisi (3 mg/kg/gün) TAA (3 gün 350 mg/kg/gün) ile oluşan karaciğer hasarını ve yüksek TBARS düzeylerini azaltmadı. Figür 5e’de görülebileceği gibi melatonin verilen grupta karaciğerde şiddetli inflamasyon vardı. Karabay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla karşılaştırıldığında çalışmamızda oksidan madde olan TAA dozunun daha yüksek ve antioksidan madde olan melatoninin daha düşük dozda kullanıldığı görülecektir. Çalışmamızda melatoninin karaciğerde lipid peroksidasyonunu önleyememesinin sebepleri Karabay ve arkadaşları tarafından ileri sürüldüğü gibi; i) melatonin antioksidan etkilerini doz bağımlı şekilde göstermesi, ii) inflamatuvar hücrelerce melatoninin antioksidan kapasitesini aşacak şekilde ROS ve RNS ürünlerinin aşırı üretilmesi, iii) yüksek TAA dozuna bağlı olarak daha fazla reaktif TAA ürünlerinin oluşması, olabilir. Çalışmamızda melatonin tedavisi barsakta doku hasarı ve yüksek barsak TBARS düzeylerini azaltmadı. Melatoninin intestinal oksidatif hasarı önlediğini bildiren birçok çalışma vardır (56-59). Sileri ve arkadaşları intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde melatoninin intestinal doku hasarını ve BT’ı azalttığını bildirmiştir (63). TAA ile oluşturulan FKY’de melatoninin intestinal oksidatif hasar ve BT üzerine etkileriyle ilgili çalışma bulunmamasına rağmen, Çetinkaya ve arkadaşları major karaciğer rezeksiyonu ile oluşturdukları karaciğer yetmezlik modelinde melatoninin barsakta histopatolojik değişiklikler üzerine protektif etki göstermeden bakteriyel translokasyonu azalttığı bildirmiştir. Bu modelde melatoninin BT’u azaltma mekanizmasının açıklanamadığı belirtilmiştir (64). Çalışmamızda intestinal histolojik değerlendirmeye ek olarak intestinal oksidatif stres değerlendirildi. Melatonin verilen grupta yüksek BT oranlarına barsakta intestinal oksidatif hasarın eşlik ettiğinin gösterilmesi (Figür 6e) TAA ile oluşturulan FKY’de BT’da intestinal oksidatif hasarın önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Melatoninin intestinal oksidatif hasarı karaciğerde olduğu gibi doz



bağımlı şekilde azalttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (96,97). Melatonin grubunda karaciğerde olduğu gibi barsak dokusunda da şiddetli inflamasyon izlendi. Bu bulgular melatoninin uygulanan dozda yukarda karaciğerdeki yetersiz antioksidan aktivitesinin sebebi olarak ileri sürülen faktörlerin barsaktaki yetersiz antioksidan aktivitesini açıklamak için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Ratlarda siroz, cerrahi karaciğer yetmezliği ve TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modellerinde İBO'nun BT'da önemli rol oynadığı gösterilmiştir (74,98,99). Çalışmamızda TAA grubunda ileal aspiratta üreyen *E. coli* sayısı kontrolden anlamlı şekilde yükseldi ( $p < 0.001$ ). TAA grubunda BT oranının %100 olması ve mezenter lenf nodu, karaciğer ve dalağa transloke olan bakteri türünün *E. coli* olduğunun saptanması yukardaki çalışmalarla uyumlu olarak İBO'un BT sürecinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. İntestinal oksidatif hasarın deneysel modellerde intestinal motiliteyi azalttığı bildirilmiştir. Bozulmuş intestinal motilite sirozda İBO'nun ana mekanizmalarından biridir. Chiva ve arkadaşları deneysel siroz modelinde antioksidanların (C vitamini ve glutamat) intestinal oksidatif stresi azaltarak ileum ve çekumda Enterobakter ve Enterokok sayılarını azalttığını ve BT'ü önlediğini bildirmesine rağmen (10) çalışmamızda antioksidan verilen üç grupta da (GB, Vit E ve melatonin) *E. coli* sayılarında ve BT oranlarında azalma olmadı. Bu çalışmada intestinal motiliteyi değerlendirmedik. Ancak bu hepatotoksiste modelinde ortaya çıkan intestinal oksidatif hasarın antioksidan tedavilerle azalmaması, intestinal oksidatif hasarın siroz modellerinde olduğu gibi intestinal motiliteyi değiştirerek İBO'a ve yüksek BT oranlarına katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak GB, Vit E ve melatonin tedavileri TAA ile oluşturulan FKY modelinde artmış intestinal oksidatif hasar, İBO ve yüksek BT oranlarını azaltmadı. Bu sonuçlar intestinal oksidatif hasarın, barsağın bariyer fonksiyonunu bozarak ve mekanizması net açıklanamasa da enterik bakteri sayısını arttırarak BT'un gelişmesinde major bir rol oynadığını düşündürmektedir. İntestinal oksidatif hasarı önleyerek intestinal mukoza bariyer fonksiyonunu koruyacak tedavi modalitelerinin geliştirilmesi aralarında FKY'nin de bulunduğu birçok ciddi klinik tabloda mortalitenin önemli nedeni olan infeksiyonların önlenmesinde önemli katkılar sağlayabilir.

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

1. TAA verilmesiyle FKY başarıyla oluşturuldu.
2. TAA verilmesiyle oluşturulan FKY'ne karaciğer ve barsakta şiddetli oksidatif hasarın eşlik ettiği gözlemlendi.
3. TAA verilmesi İBO ve BT sıklığını artırdı.
4. Gingko biloba karaciğerde oksidatif hasarı belirgin düzeltti.
5. GB, Vit E ve melatonin tedavileri intestinal oksidatif hasarı düzeltmedi.
6. GB, Vit E ve melatonin tedavileri İBO ve BT sıklığını anlamlı şekilde azaltmadı.
7. TAA verilen grupta artmış BT sıklığına intestinal oksidatif hasar ve İBO'nun eşlik etmesi bu iki faktörün BT gelişiminde önemli rol oynadığını bildiren daha önceki çalışmaları desteklemektedir.

### **ÖZET**

**RATLARDA TİYOASETAMİT İLE OLUŞTURULAN FULMİNAN HEPATİK**

## YETMEZLİKTE GİNGKO BİLOBA, VİTAMİN E VE MELATONİNİN BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Amaç: Bakteriye translokasyon (BT), fulminan karaciğer yetmezliği (FKY) gibi birçok ciddi klinik durumda infeksiyöz komplikasyonların gelişiminde yerleşmiştir.

Biz ratlarda tiyoasetamid (TAA) ile oluşturulan FKY'de Gingko biloba (GB), vitamin E (Vit E) ve melatoninin intestinal oksidatif hasar ve bakteriye translokasyon üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Toplam 42 rat 5 gruba ayrıldı. Grup1 (n=8) kontrol grubuydu. Grup 2 (n=10) TAA grubuydu ve bu grupatki ratlar 3 gün boyunca intraperitoneal (ip) olarak 350 mg/kg/gün TAA aldı. Grup 3 (n=8)'e oral 100mg/kg/gün GB, grup 4 (n=8)'e oral 200 mg/kg/gün Vit E, grup5 (n=8)'e intraperitoneal 3 mg/kg/gün melatonin tedavisi ilk TAA dozundan 48 saat önce başlandı ve devam eden 5 gün boyunca sürdürüldü.

Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TAA grubunda ciddi hepatik ve intestinal oksidatif hasar, ileal aspiratlarda artmış *Escherichia coli* sayıları ve yüksek BT sıklıkları gözlemlendi (tüm p değerleri <0.001). Sadece GB tedavisi hepatik oksidatif hasarı azalttı (p<0.001). İntestinal oksidatif hasar, ileal aspiratlardaki *E. coli* sayıları ve BT sıklıklarında TAA ve diğer antioksidan tedavi grupları arasında fark yoktu (p>0.05).

31

Sonuç: Sonuçlarımız intestinal oksidatif hasarın intestinal mukozanın bariyer fonksiyonunu bozarak BT gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriye translokasyon, fulminan karaciğer yetmezliği, oksidatif stres, tiyoasetamid, antioksidanlar, Platelet-aktivatör faktör.

32

### SUMMARY

#### THE EFFECTS OF GINGKO BILOBA, VITAMIN E AND MELATONIN ON BACTERIAL TRANSLOCATION IN THIOACETAMIDE-INDUCED FULMINANT HEPATIC FAILURE IN RATS.

Aim: Bacterial translocation (BT) has been implicated in the development of infectious complications in many serious clinical conditions such as fulminant hepatic failure (FHF). We aimed to investigate the effects of *Gingko biloba* (GB), Vit E (Vit E) and melatonin on intestinal oxidative damage and BT in thioacetamide (TAA)-induced FHF in rats.

Materials and methods: A total of 42 rats were divided into five groups. Group 1 (n=8) was the control group. Group 2 (n=10) was the TAA group, in which rats received 350 mg/kg TAA daily by the intraperitoneal (ip) route for 3 days. Oral 100 mg/kg GB per day was administered to group 3 (n=8), oral 200 mg/kg Vit E per day to group 4 (n=8) and ip 3 mg/kg melatonin per day to group 5 (n=8) 48 h prior to the first TAA injection and was continued for 5 consecutive days.

Results: When compared with the control group, serious hepatic and intestinal oxidative damage, increased *Escherichia coli* counts in ileal aspirates and high BT frequencies were observed in the TAA group (all p<0.001). Only GB treatment attenuated hepatic oxidative damage (p<0.001). There was no difference in intestinal oxidative damage, *E.*

33

*coli* counts in ileal aspirates and BT frequency between TAA and the other antioxidant treatment groups (p>0.05).

Conclusion: Our results suggest that intestinal oxidative damage plays a major role in the development of BT by disrupting the barrier function of intestinal mucosa.

Keywords: Bacterial translocation, fulminant hepatic failure, oxidative stress, thioacetamide, antioxidants, Platelet-activating factor.

34

#### **KAYNAKLAR**

1. Mummery RV, Braley JM, Jeffries DJ. Microbiological monitoring of patients in hepatic failure with particular reference to extracorporeal porcine liver perfusion. *Lancet* 1971;2:60-4.
2. Bismuth H, Samuel D, Gugenheim J. Emergency liver transplantation for fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1987;107:337-41.
3. Rakela J, Lange SM, Ludwig J. Fulminant hepatitis: Mayo Clinics experience with 34 cases. *Mayo Clin Proc* 1985;60:289-92.
4. De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: Effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005;33:1125-35.
5. Goris JA, Boekhorst TPA, Nuytinck JKS, et al: Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Ann Surg* 1985;120:1109-15.
6. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *Burn Care Rehabil* 2005;26:383-91.
7. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990;30:S184-9.
8. Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;38:1508-15.
9. Adawi D, Kasravi FB, Molin G, Jeppsson B. Effect of Lactobacillus supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatology* 1997;25:642-7.
10. Chiva M, Soriano G, Rochat I, Peralta C, Rochat F, Llovet T, Mirelis B, Schiffrin EJ, Guarner C, Balanzo J. Effect of Lactobacillus johnsonii La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002;37:456-62.
11. Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H, Atik U, Oral U. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002;46:171-5.
12. Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, Dirlik M, Camdeviren H, Aydin S. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns* 2004;30:778-84.

35

13. LeVoyer T, Cioffi WG Jr, Pratt L, Shippee R, McManus WF, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg* 1992;127:26-9.
14. Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, Bonser RS, Elliott TS, Marshall T, Mountford PJ, Bion JF. Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996;275:1007-12.
15. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-7.
16. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. The effect of vitamin C and vitamin E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats. *Eur Surg Res*

1997;29:187-94.

17. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats. *Gut* 1996;39:48-53.
  18. Zhang F. Protective effect of a platelet activating factor antagonist in experimental liver injury. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1990;70:375-8.
  19. Longo WE, Politics G, Vernava AM 3<sup>rd</sup>, Deshpande Y, Niehoff M, Chandel B, Kulkarni A, Kaminski DL. Platelet-activating factor mediates trinitrobenzene induced colitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994;51:419-24.
  20. De Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, Knowles CH, Leite KR, Jancar S, Monteiro Cunha JE, Machado MC. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2001;5:364-70.
  21. Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A, Andersson R. Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000;17:57-65.
  22. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRC, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
  23. Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996;20:35-43.
  24. Gertz HJ, Kiefer M. Review about *Gingko biloba* special extract EGb 761 (*Gingko*). *Curr Pharm Des* 2004;10:261-4.
  25. Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of *Gingko biloba* (EGb 761) in rats. *Phytother Res* 2001;15:449-51.
  26. Zeybek N, Gorgulu S, Yagci G, Serdar M, Simsek A, Kaymakcioglu N, Deveci S, Ozcelik H, Tufan T. The effect of *Gingko Biloba* Extract (EGb 761) on experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003;115:286-93.
  27. Bekerecioğlu M, Tercan M, Ozyazgan I. The effect of *Gingko biloba* extract (EGb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in rats. A comparative study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1998;32:135-9.
  28. Kose K, Dogan P. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. 2. Comparison of the antioxidant effect of *Gingko biloba* extract (EGb 761) with those of water-soluble and lipid-soluble antioxidants. *J Int Med Res* 1995;23:9-18.
- 36
29. Ertekin MV, Kocer I, Karslioglu I, Taysi S, Gepdiremen A, Sezen O, Balci E, Bakan N. Effects of oral *Ginkgo biloba* supplementation on cataract formation and oxidative stress occurring in lenses of rats exposed to total cranium radiotherapy. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:499-502.
  30. Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. *Ginkgo biloba* prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004;340:153-162.
  31. Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl<sub>4</sub> rats. *Am J Chin Med* 2004;32:21-31.

32. Huang SZ, Luo YJ, Wang L, Cai KY. Effect of ginkgo biloba extract on livers in aged rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:132-5.
33. Shenoy KA, Somayaji SN, Bairy KL: Evaluation of hepatoprotective activity of Ginkgo biloba in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002;46:167-74.
34. Pehlivan M, Dalbeler Y, Hazinedaroglu S, Arikan Y, Erkek AB, Gunal O, Turkcapar N, Turkcapar AG. An assessment of the effect of Ginkgo Biloba EGb 761 on ischemia reperfusion injury of intestine. *Hepatogastroenterology* 2002;49:201-4.
35. Chao JC, Hung HC, Chen SH, Fang CL. Effects of Ginkgo biloba extract on cytoprotective factors in rats with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2004;10:560-6.
36. Tucker JM, Townsend DM. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed Pharmacother* 2005;59:380-7.
37. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 2005;25:151-74.
38. Gonzalez R, Sanchez de Medina F, Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *Int J Vitam Nutr Res* 2001;71:243-50.
39. Srigiridhar K, Nair KM. Supplementation with alpha-tocopherol or a combination of alpha-tocopherol and ascorbic acid protects the gastrointestinal tract of iron-deficient rats against iron-induced oxidative damage during iron repletion. *Br J Nutr* 2000;84:165-73.
40. Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Toker G, Uysal M. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci* 2000;66:1905-13.
41. Shebani KO, Stucchi AF, McClung JP, Beer ER, LaMorte WW, Becker JM. Role of stasis and oxidative stress in ileal pouch inflammation. *J Surg Res* 2000;90:67-75.
42. Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg* 1999;42:427-31.
43. Tunez I, Munoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijoo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2005;24: [Epub ahead of print]
44. Sarkar K, Ghosh A, Sil PC. Preventive and curative role of a 43kD protein from the leaves of the herb *Cajanus indicus* L on thioacetamide-induced hepatotoxicity in vivo. *Hepatol Res* 2005;5: [Epub ahead of print]
45. Reis E, Kama NA, Coskun T, Korkusuz P, Ors U, Aksoy M, Kulacoglu S. Effects of octreotide and alpha-tocopherol on bacterial translocation in experimental intestinal obstruction: a microbiological, light and electronmicroscopical study. *Hepatogastroenterology* 1997;44:656-63.
46. Nishida S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine* 2005;27:131-6.
- 37
47. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod.* 1998;3:13-22.
48. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119-30.
49. Karabay G, Aldemir D, Akin E, Ogus E, Gur G, Boyacioglu S, Turkoglu S. The effect of melatonin treatment on oxidative and nitrosative stress in rats with

- thioacetamide-induced hepatic damage. *Hepato Res* 2005;31:160-7.
50. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003;469:145–52.
51. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003;34:282–7.
52. Sener G, Sehirli AO, Ayanoglu-Dulger G. Protective effects of melatonin, vitamin E and *N*-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J Pineal Res* 2003;35:61–8.
53. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Gascon F, Munoz MC, Gomez M, Pera C. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extrahepatic bile duct ligation in rats. *J Pineal Res* 2001;31:138–44.
54. Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000;28:119–26.
55. Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Preventive effect of melatonin on the progression of  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res* 2003;34:185–93.
56. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J Pineal Res* 1995; 19:31–39.
57. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct.* 2004;22:169-78.
58. Ozacmak VH, Sayan H, Arslan SO, Altaner S, Aktas RG. Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sci* 2005;76:1575-88.
59. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, Caputi AP. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res* 2001;30:1-12.
60. Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Munoz-Castaneda JR, Caballero FJ, Briceno J, Marchal T, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005;39:143-50.
61. Tunez I, Munoz MC, Villavicencio MA, Medina FJ, de Prado EP, Espejo I, Barcos M, Salcedo M, Feijoo M, Montilla P. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res* 2005;52:223-8.
62. Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* 2004;40:86-93.
63. Sileri P, Sica GS, Gentileschi P, Venza M, Benavoli D, Jarzembowski T, Manzelli A, Gaspari AL. Melatonin reduces bacterial translocation after intestinal ischemiareperfusion injury. *Transplant Proc* 2004;36:2944-6.
- 38
64. Cetinkaya Z, Ulger H, Akkus MA, Dogru O, Cifter C, Doymaz MZ, Ozercan IH. Influence of some substances on bacterial translocation in the rat. *World J Surg* 2002;26:9-12. Epub 2001 Nov 22.

65. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004 ;36:1-9.
66. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316-28.
67. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002;27:219-22.
68. Chen CT, Chu CJ, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Chan CC, Wang SS, Huang HC, Lee SD. Evidence against a role for endotoxin in the hepatic encephalopathy of rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:450-5.
69. Pawa S, Ali S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:210-22.
70. Sun F, Hayami S, Ogiri Y, et al. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:181-5.
71. Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatology* 1999;31:27-38.
72. Searle P. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen-a review. *Analyst* 1984;109:549-68.
73. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
74. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26:1372-78.
75. Ranow JS, Fink MP. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Brit Anest* 1996;77:71-81.
76. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:143-51.
77. Schoenberg MH, Beger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993;21:1376-86.
78. Langer JC, Sohal SS, Hamilton PB: Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury: An exploration of possible mechanisms. *J Pediatr Surg* 1995;30:568-72.
79. Miller MJ, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Clark DA. SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 1988;255:G556-65.
80. Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Lafon L, Dajas F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2004;91:13-20.
81. Sun Z, Wang X, Lasson A, Borjesson A, Leveau P, Haraldsen P, Andersson R. Roles of platelet-activating factor, interleukin-1beta and interleukin-6 in intestinal barrier dysfunction induced by mesenteric arterial ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1999;87:90-100.

82. Grypioti AD, Theocharis SE, Papadimas GK, Demopoulos CA, Papadopoulou-Daifoti Z, Basayiannis AC, Mykoniatis MG. Platelet-activating factor (PAF) involvement in acetaminophen-induced liver toxicity and regeneration. *Arch Toxicol* 2005;79:466-74.
83. Grypioti AD, Theocharis SE, Demopoulos CA, Papadopoulou-Daifoti Z, Basayiannis AC, Mykoniatis MG. Effect of platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist (BN52021) on acetaminophen-induced acute liver injury and regeneration in rats. *Liver Int.* 2006;26:97-105.
84. Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A. Intestinal antiinflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1949-59.
85. Yang XF, Wang NP, Lu WH, Zeng FD. Effects of Ginkgo biloba extract and tanshinone on cytochrome P-450 isozymes and glutathione transferase in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1033-38.
86. Gong QH, Wu Q, Huang XN, Sun AS, Shi JS. Protective effects of Ginkgo biloba leaf extract on aluminum-induced brain dysfunction in rats. *Life Sci* 2005;77:140-8.
87. Chen SH, Liang YC, Chao JC, Tsai LH, Chang CC, Wang CC, Pan S. Protective effects of Ginkgo biloba extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:3746-50.
88. Shen J, Wang J, Zhao B, Hou J, Gao T, Xin W. Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1998;1406:228-36.
89. Akyurek N, Salman B, Irkorucu O, Tezcaner T, Azili C, Erdem O, Akca G, Akin O, Tatlicioglu E. The effect of platelet activating factor antagonist BN 52021 on bacterial translocation and ICAM-I expression in experimental obstructive jaundice. *J Invest Surg* 2005;18:247-56.
90. Bedirli A, Gokahmetoglu S, Sakrak O, Soyuer I, Ince O, Sozuer E. Beneficial effects of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase and BN 52021 on bacterial translocation in cerulein-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 2004;36:136-41.
91. Kalender Y, Yel M, Kalender S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology* 2005;209:39-45. Epub 2005 Jan 8.
92. Sodergren E, Cederberg J, Vessby B, Basu S. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur J Nutr* 2001;40:10-6.
93. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003;50:1129-46.
94. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002;2:181-97.
95. Tunez I, Munoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijoo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro-and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2005;24:[Epub ahead of print]
96. Kazez A, Demirbag M, Ustundag B, Ozercan IH, Saglam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2000;35:1444-8.



97. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Caputi AP. Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J Pineal Res* 1998;25:24-33. 40
98. Wang XD, Soltesz V, Andersson R, Bengmark S. Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 percent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 1993;80:66-71.
99. Yi JH, Ni RY, Luo DD, Li SL. Intestinal flora translocation and overgrowth in upper gastrointestinal tract induced by hepatic failure. *World J Gastroenterol* 1999;5:327-9.