

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER YETMEZLİĞİNDE PROBİYOTİKLERİN
KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Mine SAYILGAN KARAKAYA

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet İŞLER**

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1366-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.

2008 - ISPARTA

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet İŞLER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Doç.Dr. H. Şenol COŞKUN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL'a, laboratuvar çalışmamda emeği geçen Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, Dr. Medine Cumhuri Cüre'ye ve tez yazılmasında bana yardımcı olan değerli arkadaşım Dr. Sema S.GÖKSU'ya beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, eğitimim süresince desteklerini daima hissettiğim anneme, babama, çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan eşime ve canım kızıma en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Mine SAYILGAN KARAKAYA

KISALTMALAR

AKY	: Akut karaciğer yetmezliği
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
Cas	: Kaspaz
CAT	: Katalaz
CCl₄	: Karbon tetraklorür
D-GalN	: D-Galaktozamin
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
i.p	: İntraperitoneal
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OH⁻	: Hidroksil iyonu
SF	: Serum fizyolojik
SM	: Skimmilk
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
UTP	: Uridin trifosfat

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fulminan Hepatik Yetmezlik.....	3
2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği Etiyolojisi	4
2.1.2. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Semptomlar.....	4
2.1.3. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Etiyolojiye Yönelik Testler	5
2.1.4. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Tedavi	6
2.2. Deneysel Karaciğer Yetmezliği Modelleri	7
2.3. D-galaktozamin (D-GalN)	8
2.3.1. D - Galaktozamin Hepatitinde Apoptozis ve TNF- α	10
2.3.1.1. Apoptozis	10
2.3.1.2. TNF- α	11
2.3.1.3. D-Galaktozamine Bağlı Karaciğer Hasarında Apoptozis ve TNF - α	12
2.4. Probiyotikler	13
2.4.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri	13
2.4.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	13
2.4.3. Probiyotiklerin Biyolojik Etkileri	14
2.4.4. Probiyotiklerin Antibakteriyel Mekanizması.....	15
2.4.5. Probiyotiklerin Adezyon Mekanizması	16
2.4.6. Probiyotiklerin Antiapoptotik Etkisi.....	16
2.4.7. Probiyotiklerin Antioksidan Etkisi	16
2.4.8. Probiyotiklerin Immunité Üzerine Etkileri	17
2.4.9. Sağlıklı Bireyde Probiyotik Kullanımı	17
2.4.10. Probiyotiklerin Güvenilirliği.....	18
2.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres.....	18

2.5.1. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	19
2.5.1.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	19
2.5.1.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler.....	20
2.5.2. Nonenzimatik ve Enzimatik Antioksidan Sistemler	20
2.5.2.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	20
2.5.2.2. Enzimatik Antioksidanlar	20
2.5.2.2.1. Glutasyon Peroksidaz	20
2.5.2.2.2. Katalaz	21
2.5.2.2.3. Süperoksit Dismutaz	21
3. MATERYAL ve METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Yöntem.....	23
3.1.2. Probiyotiklerin Hazırlanması	24
3.2. Metod	24
3.2.1. Deney Protokolleri	24
3.2.1.1. Deney 1 Protokolü	24
3.2.1.1.1. Kan ve Doku Örneklerin Alınması	27
3.2.1.2. Deney 2 Protokolü	27
3.2.1.2.1. Kan ve Doku Örneklerin Alınması	29
3.2.1.2.2. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması	29
3.2.1.2.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler.....	29
3.2.1.2.2.2. Homojenizasyon	29
3.2.1.2.3. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri	30
3.2.1.2.4. Histolojik Değerlendirme	30
3.2.1.2.5. Bakteri Kültürleri	31
3.2.1.2.6. İstatistik Değerlendirme.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Deney 1	32
4.1.1. Deney 1'deki Karaciğer Fonksiyon Testleri Aktiviteleri	32
4.2. Deney 2	34
4.2.1. Sıçanlardaki Ağırlık Değişiklikleri.....	34

4.2.2. Sıçanlardaki Karaciğer Ağırlık Değişiklikleri	35
4.2.3. Karaciğer Fonksiyon Testleri Aktiviteleri (AST, ALT, ALP).....	36
4.2.4. Karaciğer Dokusunda GSH Düzeyleri.....	39
4.2.5. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Düzeyleri (CAT, SOD, GSH-Px).....	39
4.2.6. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri	42
4.2.7. Karaciğer Dokusunda TNF- α Düzeyleri.....	43
4.2.8. Karaciğer Dokusunda NO Düzeyleri	44
4.2.9. Histolojik Değerlendirme	45
4.2.10. Bakteri Kültürleri.....	46
TARTIŞMA	47
SONUÇ	53
ÖZET	54
SUMMARY	56
EK 1	58
KAYNAKLAR	60

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Akut karaciğer yetmezliği sınıflaması	3
Tablo 2. Akut karaciğer yetmezliği etiyojisi	4
Tablo 3. Hepatik ensefalopati evreleri	5
Tablo 4. Akut karaciğer yetmezliğinde etyolojiye yönelik testler	6
Tablo 5. Akut karaciğer yetmezliğinde destek tedavisi	6
Tablo 6. D-Galaktozamin ile yapılan deneysel AKY çalışmaları	8
Tablo 7. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalara örnekler	14
Tablo 8. Probiyotik bakterilerin biyolojik etkileri	15
Tablo 9. Kullanılan malzeme ve aletler	23
Tablo 10. Deney protokolü 1	27
Tablo 11. Deney protokolü 2	28
Tablo 12. Deney 1 çalışma gruplarında ALT ve AST aktiviteleri.....	33
Tablo 13. Çalışma başlangıcı ve sakrifikasyon öncesi sıçanların ortalama ağırlıkları... 34	
Tablo 14. Sıçanlardaki karaciğer ağırlık değişiklikleri.....	36
Tablo 15. Deney 2 karaciğer fonksiyon testleri aktiviteleri.....	37
Tablo 16. Karaciğer dokusunda GSH düzeyleri	39
Tablo 17. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri (CAT, SOD, GSH-Px)... 40	
Tablo 18. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri.....	42
Tablo 19. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri	44
Tablo 20. Karaciğer dokusunda NO düzeyleri	45
Tablo 21. Sıçanların gruplara göre histolojik değerleri	46
Tablo 22. Deneyde kullanılan malzemeler	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Serum ALT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı.....	33
Şekil 2. Serum AST aktivitelerinin gruplara göre dağılımı	34
Şekil 3. Serum AST aktivitelerinin gruplara göre dağılımı	38
Şekil 4. Serum ALT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı.....	38
Şekil 5. Serum ALP aktivitelerinin gruplara göre dağılımı	38
Şekil 6. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı	39
Şekil 7. Karaciğer dokusunda CAT düzeylerinin gruplara göre dağılımı	41
Şekil 8. Karaciğer dokusunda SOD düzeylerinin gruplara göre dağılımı	41
Şekil 9. Karaciğer dokusunda GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	41
Şekil 10. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri gruplara göre dağılımı	43
Şekil 11. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı	44
Şekil 12. Karaciğer dokusunda NO düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	45

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut karaciğer yetmezliği (AKY) masif hepatik yetmezlik ile seyreden klinik bir sendromdur. AKY'ne yönelik deneysel karaciğer yetmezliği modellerinin oluşturulması hem hastalığın altında yatan patofizyolojik koşulları anlamamızı sağlar, hem de yeni tedaviler geliştirilmesine yardımcı olur (1). Deneysel karaciğer yetmezliği modelleri cerrahi veya kimyasal olarak yapılmaktadır.

D-galaktozamin (D-GalN) karaciğerde galaktoz yolağı ile metabolize olan bir amino şekerdir. Selektif bir hepatotoksindir (2). D-GalN, hücresel üridin trifosfat konsantrasyonunu azaltmak suretiyle RNA ve protein sentezini inhibe ederek, karaciğer hücre nekrozuna neden olmaktadır (3).

D-GalN'in deney hayvanlarında neden olduğu karaciğer lezyonunun morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin, insan viral hepatitindekine birçok açıdan benzediği bildirilmiştir (4).

D-GalN'in sitotoksik etkisinde, endojen lipidlerin peroksidasyonunun major faktör olduğu gösterilmiştir (5).

Önceki çalışmalarda, sıçanlarda D-GalN ile indüklenen karaciğer lezyonlarında, hem lokal defans mekanizmalarının, hem de retiküloendoteliyal sistem fagositik fonksiyonunun ciddi şekilde azaldığı ve *Lactobacillus* ön tedavisinin makrofaj metabolik aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (6). D-GalN enjeksiyonu ile karaciğer lezyonu uyarılmasından önce, uygulanan *Lactobacillus plantarum* ön tedavisinin, bakteriyel translokasyonu ve karaciğer hücre hasarını azalttığı da saptanmıştır (7).

Probiyotikler son zamanlarda sık olarak kullanılmakta ve probiyotiklerle ilgili olarak çok geniş çalışmalar yapılmaktadır. Değişik sistemlerde toksik etkisi bilinen D-GalN'in yan etkisinin probiyotiklerce engellenip engellenemeyeceğinin ortaya konulması probiyotiklerin yeni kullanım alanlarını ortaya koyacaktır. Biz çalışmamızda D-GalN ile uyarılan akut karaciğer hasarında probiyotiklerin bu hepatotoksik etkiyi azaltmada bir faydasının olup olmadığını araştırmayı hedefledik.

Bu amaçla probiyotiklerin D-GalN hepatitinde karaciğer dokusunda olası olumlu etkinliğin mekanizmasına açıklık getirmek için, enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz

(GSH-Px); non-enzimatik antioksidan olan glutatyon (GSH); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA); proinflatuar bir stokin olan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve Nitrik oksit (NO) tayini yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fulminan Hepatik Yetmezlik

Fulminan hepatik yetmezlik ilk defa Trey ve Devidson tarafından daha önceden karaciğer hastalığı olmayan bir kişide semptomların başlamasından sonraki 2 hafta içinde mental durumda değişiklikler olması olarak tanımlanmıştır (8). Daha sonraki yıllarda bu tanımda çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bu hastalar için genel bir terim olan AKY ilk kez O'Grady ve arkadaşlarınca önerilmiştir. Bu araştırmacılar 539 hastanın retrospektif analizine dayanarak karaciğer yetmezliği hastalarını semptomların ortaya çıkışından ensefalopatinin oluşmasına kadar geçen süreye göre 3 gruba ayırmışlardır. Ensefalopatinin semptomların başlangıcından itibaren ilk haftada ortaya çıktığı vakalar hiperakut, 8-28 günde ortaya çıktığı vakalar akut, 29 gün-12 hafta arasında ortaya çıktığı vakalar subakut karaciğer yetmezliği olarak tanımlanmıştır (9). AKY sınıflaması tablo 1'de gösterilmiştir (10).

Tablo 1. Akut karaciğer yetmezliği sınıflaması

Ensefalopati semptomlarının ortaya çıkış-zamanları		Etiyoloji
Hiperakut karaciğer yetmezliği	< 7 gün	Parasetamol toksitesi, viral hepatit A, hepatit B infeksiyonu
Akut karaciğer yetmezliği	7-28 gün	Viral hepatit A, B, E infeksiyonları, idiyosenkratik ilaç reaksiyonu, NANB hepatit
Subakut karaciğer yetmezliği	28 gün-5 hafta	NANB hepatit
NANB = non-A non-B hepatit		

Murphy N. An update in acute liver failure: when to transplant and the role of liver support devices. *Clin Med.* 'den alınmıştır.

2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği Etiyolojisi

AKY'nin en sık nedenleri viral hepatitler, asetaminofen toksitesi ve idiosenkratik ilaç reaksiyonlarıdır (11). AKY yapan nedenler tablo 2'de gösterilmiştir(12).

Tablo 2. Akut karaciğer yetmezliği etiyolojisi

<p>A: Viral HAV, HBV±HDV, HEV, HSV, CMV, EBV, HV2, adenovirus, hemorajik ateş yapan viruslar</p> <p>B: İlaçlar ve toksinler 1: Doza bağımlı karaciğer hasarı yapanlar Asetaminofen, CCl₄, sarı fosfor, <i>Amanita phalloides</i>, <i>Bacillus cereus</i> toksini, sulfonamidler, tetrasiklin, ekstazy, bitkisel ilaçlar 2: İdiosenkratik yolla karaciğer hasarı yapanlar Halotan, izoniazid, rifampisin, valproik asid, NSAİİ, İNH, disulfan</p> <p>C: Vasküler nedenler Budd-Chaiari sendromu, veno-okulzif hastalık, şok karaciğeri, sağ kalp yetmezliği</p> <p>D: Metabolik Gebeliğin akut yağlı karaciğeri, Wilson hastalığı, Reye sendromu, Herediter fruktoz intoleransı</p> <p>E: Diğer nedenler Malign infiltrasyon (karaciğer metastazı, lenfoma), otoimmün hepatit, sepsis</p> <p>F: Nedeni belirlenemeyen</p>
<p>HAV: hepatit A virusu, HBV: hepatit B virusu, HDV: hepatit D virusu, HEV: hepatit E virusu, HSV: herpes simplex virus, CMV: Sitomegalovirus, EBV: Epstein Barr virus, HZV: Herpes varicella zoster virusu, CCl₄: Karbon tetraklorür, İNH: İsoniazid, NSAİİ: Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar</p>

David A. Sass and A. Obaid Shakil. Fulminant Hepatic Failure. *Liver Transplantation*, Vol 11, No6(June),2005:pp 594-605' den alınmıştır.

2.1.2. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Semptomlar

AKY'nin başlangıç semptomları halsizlik, bulantı, anoreksi, kusma, karın ağrısı ve ateştir (13). Bu semptomlara ensefalopati, koma ve çoğunlukla koagulopati eşlik eder.

Hepatik ensefalopati duygulanım değişiklikleri, uykusuzluk, konsantrasyon güçlüğünden (evre 1) komaya (evre 4) kadar farklı şekillerde görülebilir. Serebral ödem evre 4 ensefalopatisi olan hastaların çoğunluğunda görülür (14), otopsi serilerinde

fulminan hepatik yetmezliğe bağlı ölümlerin en sık nedeni olarak bulunmuştur (15) .
Hepatik ensefalopati evreleri tablo 3’te gösterilmiştir (10).

Tablo 3. Hepatik ensefalopati evreleri

Evre	Mental durum	Tremor	EEG
I	Öfori veya depresyon, dalgalanma gösteren hafif konfüzyon, algı ve ifadede yavaşlama, anlamsız konuşma, uyku düzensizlikleri	ince	genellikle normal
II	Evre 1 deki semptomlar belirginleşir, uykuya meyillidir, sfinkter kontrolü sağlanamaz	mevcut	anormal, jeneralize yavaşlama
III	Çoğu zaman uyur, ama uyandırılabilir, konuşma anlamsızdır, konfüzyon belirgindir	hasta koopere ise belirgindir	anormal
IV	Uyandırılmaz, ağrılı uyaran yanıtı olabilir ya da olmayabilir	yok	anormal

Murphy N. An update in acute liver failure: when to transplant and the role of liver support devices. *Clin Med.* 2006 Jan-Feb;6(1):40-6’den alınmıştır.

2.1.3. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Etiyolojiye Yönelik Testler

AKY oluşmasından sonra etiyojii anlamaya yönelik birçok test mevcuttur. AKY’nde etiyojiiye yönelik yapılabilecek testler tablo 4’te gösterilmiştir (16).

Tablo 4. Akut karaciğer yetmezliğinde etyolojiye yönelik testler

Etyoloji	Testler
HAV	HAV Ig M
HBV, HDV	Hbs Ag (-) olabilir, Anti HbcIg M ve HBV DNA
HEV	Anti HEV
Parasetamol	Kan ilaç düzeyi
İdiosenkrazik ilaç reaksiyonu	Kanda eozinofil sayımı
Otoimmün	Otoantikörler, Ig G
Gebelikle ilişkili durumlar - Yağlı Karaciğer - HELLP sendromları	USG, ürik asit, histoloji Platelet sayısı, transaminazlar
Wilson hastalığı	Üriner bakır, seruloplazmin, yarık lamba incelenmesi
Budd- Chiari	Doppler USG veya venografi
Malignite	Görüntüleme / histoloji
İskemik hepatit	Transaminazlar
HAV: hepatit A virus, HBV: hepatit B virus, HDV: hepatit D virus, HEV: hepatit E virus, HELLP: "Hemolysis, Elevated liver Enzymes, Low Platelets"	

O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J.* 2005 Mar;81(953):148-54'den alınmıştır.

2.1.4. Akut Karaciğer Yetmezliğinde Tedavi

AKY'nin spesifik bir tedavisi yoktur. Mortalitesi yüksektir ve kanıtlanmış bilinen tek tedavi seçeneği karaciğer transplantasyonudur. Genel destek tedavisi ile takip edilmektedir. AKY'de genel destek tedavisi tablo 5'te gösterilmiştir (17).

Tablo 5. Akut karaciğer yetmezliğinde destek tedavisi

1. Gereksiz sedasyon önerilmez
2. Monitorizasyon: 4-6 saate bir nörolojik değerlendirilme, kan glukozu, asit-baz elektrolitler ve PT takibi
3. Sıvı dengesinin sağlanması
4. Koagülasyon için destek (TDP, kriopresipitat)
5. Destek tedavide kullanılacak ilaçlar: Vitamin K, H2 blokerleri, PPI'leri, sukralfat, laktuloz, N-asetilsistein ± geniş spektrumlu antibiyotikler
6. Nutrisyonun sağlanması: Enteral beslenme, eğer hasta ventilatöre bağlı ise parenteral beslenme
PT: protrombin zamanı, TDP: Taze donmuş plazma, PPI: proton pompa inhibitörü

Kelly DA. Managing liver failure. *Postgrad Med J.* 2002 Nov;78(925):660-7'den alınmıştır.

2.2. Deneysel Karaciğer Yetmezliği Modelleri

Deneysel karaciğer yetmezliği modellerinin oluşturulması hem hastalığın altında yatan patofizyolojik koşulları anlamamızı sağlar, hem de yeni tedaviler geliştirilmesine yardımcı olur. Terblanahe ve Hickman ideal bir deneysel karaciğer yetmezliği modelinin özelliklerini şu şekilde sıralamıştır (1).

- 1- Oluşturulan karaciğer yetmezliği potansiyel olarak geri dönüşebilir olmalıdır.
- 2- Karaciğer hasarı tekrarlanabilir olmalıdır.
- 3- Selektif karaciğer hasarı oluşturmalıdır ve karaciğer yetmezliğine bağlı ölüm, klinikte gözlenenle hemen hemen aynı sürede gerçekleşmelidir.
- 4- Terapötik yaklaşımların uygulanabilmesi için hastalığın ortaya çıkışı ile hastalığa bağlı ölüm arasında yeterli zaman olmalıdır.
- 5- Deneysel bulguların insanlarda da kullanılabilmesi için yeterli büyüklükte hayvanlar kullanılmalıdır.
- 6- Deneysel karaciğer yetmezliği oluşturmak için kullanılan toksin laboratuvar personeli için risk oluşturmamalıdır (1).

Deneysel karaciğer yetmezliği cerrahi veya kimyasal olarak oluşturulabilir.

Cerrahi modeller: Cerrahi olarak oluşturulan deneysel karaciğer yetmezliği modelleri karaciğerin çıkarılması (anhepatik modeller) veya karaciğere kan akımının durdurulmasını içerir (devaskülarizasyon modelleri) (2).

Kimyasal modeller: Kimyasal olarak karaciğer yetmezliği oluşturmakta kullanılan pek çok toksin vardır. Bunlar CCl_4 (18), D-GalN (3, 19, 20, 21, 22), asetaminofen (23), tiyoasetamid (24), nitrozaminler (25), halojelenmiş anesteziklerdir(26).

Bizim çalışmamızda karaciğer yetmezliği oluşturmak için D-GalN kullanılmıştır. Tablo 6'da D-GalN'in kullanıldığı deneysel AKY çalışmaları özetlenmiştir (19, 20, 21, 22).

Tablo 6. D-Galaktozamin ile yapılan deneysel AKY çalışmaları

	Referanslar			
	Blitzer et al (19)	Stelaff et al. (20)	Diaz-Buxo et al. (21)	Kalpana et al.(22)
Türler	F1-hybrid tavşanları	Morigrel köpekleri	Morigrel köpekleri	Domuz
Sayı	34	18	10	14
Ağırlık(kg)	1-2	27-30	28-35	8-15
D-GalN dozu(iv)	4,25 mmol/kg	1,0 g/kg	1,0 g/kg	1,0 g/kg
Kontrol	Yok	%5 Dekstroz inf.	Yok	%5 Dekstroz inf.
Anestezi maruziyeti	Yok	Sürekli Halotan	Yok	Yok
AKY değerlendirilmesi	Glukoz, KCFT, PT, amino asid	Glukoz, KCFT, PT, amino asid	Glukoz, KCFT, PT, endotoksin, keratin, kc. bx	Glukoz, KCFT, PT, keratin, kc. bx
Komannın değerlendirilmesi	Amonyak, EEG	KİBAS	Klinik değerlendirme	Amonyak, beyin otopsi, klinik
Koma süresi	Zaman verilmemiş	%80'i 30 saat	Zaman verilmemiş	7-8 saat
Ölüm süresi saat (hayvanların %'si)	<27 (%59) 27-44 (%21) 44-91 (%15)	<2 (%20) 33-36 (%60) 37-42 (%20)	<27 (%10) 27-44 (%20) 44-72 (%50)	Tümü 77-86 saat arasında
Yaşayanlar	%6	Yok	%20	Yok

KCFT: karaciğer fonksiyon testleri, PT: protrombin zamanı, EEG: elektroensefalogram, KİBAS: intrakranial basınç, AKY: Akut karaciğer yetmezliği, Kc. bx: karaciğer biyopsisi

Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, et al. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978;74:664-671,

Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS, et al. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1995;21:796-804,

Diaz-Buxo JA, Blumenthal S, Hayes D, Gores P, Gordon B. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 1997;25:950-957,

Kalpana K, Ong HS, Soo KC, Tan SY, Raj JP. An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res* 1999;82:121-130'den alınmıştır.

2.3. D-galaktozamin (D-GalN)

D-GalN karaciğerde galaktoz yolağı ile metabolize olan bir amino şekerdir. Selektif bir hepatotoksindir (2). D-GalN'in intraperitoneal (i.p) uygulaması hepatositlerde intrasellüler uridin trifosfat (UTP) havuzunu azaltarak RNA ve protein sentezini engeller (3). İ.p olarak uygulandığında sıçanlarda serum transaminaz düzeylerinin artışına, hepatik nekroza ve komaya yol açar (27). D-GalN'in neden olduğu karaciğer lezyonlarının morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin insan viral hepatitine bir çok açıdan benzediği bildirilmiştir (3).

D-GalN'nin sitotoksik etkisinde endojen lipidlerin peroksidasyonunun önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (5). D-GalN'nin neden olduğu oksidatif hasarlanma genellikle lipid peroksidasyonunun uyarıcısı ve hücre membranının yıkımının kaynağı olan hidroksil radikali (OH[•]) oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (28).

D-GalN verilmesinden sonra karaciğerde serbest oksijen (O₂^{•-}) radikal reaksiyonlarının medyatörleri olan lipid hidroksiperoksitlerin konsantrasyonu artar (29). Sıçanlardaki D-GalN hepatitinde; superoksit dismutaz, CAT ve GSH-Px gibi antioksidatif enzimlerin aktivitelerinin azalmış olduğu da bildirilmiştir (30).

D-GalN uygulanmasının ardından sıçan karaciğerinde apoptozis geliştiği histokimyasal olarak gösterilmiştir (27, 31, 32, 33). D-GalN verilmesinden 18-24 saat sonra apoptoziste rol alan bir proteaz olan kaspaz 3 (Cas3) aktivitesi artar (32). Cas3 aktivitesi, D-GalN verilen sıçanlarda CC1₄ (34) veya tiyoasetamid verilen sıçanlara göre (33) daha yüksektir. D-GalN intoksikasyonunda apoptozis insidansının yüksek olması, kısmen D-GalN toksitesinin karaciğer hücrelerinde kaspazları aktive ederek apoptozise yol açan TNF- α aracılığıyla oluşmasıyla açıklanabilir (35,36). TNF- α infeksiyon, yetmezlik, inflamasyon patogeneğinde primer rol oynayan bir sitokindir. Konak defansı ve doku homeostazında önemli rol oynar. Endotoksemi sırasında TNF- α 'nın akut sistemik salınımı karaciğer hasarı ve mortalite üzerinde merkezi bir rol oynar (37). Tersine, dokulardan düşük düzeylerde TNF- α salınması yararlı etkiler sağlar (38).

D-GalN'e bağlı karaciğer hasarı, artmış TNF- α düzeyleri ile korele bulunmuştur (27). Hepatositlerde TNF- α düzeylerinin artışı apoptotik cisimciklerde artışla beraberdir (39).

TNF- α düzeylerinde artışla karaciğer hasarı arasındaki ilişki alkolik hepatit (40), iske mi ve reperfüzyon sonrasında ve karaciğer transplantasyonu sonrasında allograft rejeksiyonunda da gösterilmiştir (41). D-GalN'e bağlı karaciğer yetmezliğinde anti-TNF- α antikorlarının verilmesi apoptozisi ve nekrozu azaltır. TNF- α antikorlarının verilmesi alanin transaminaz (ALT) düzeylerini ancak %65 oranında azaltır. Bu sonuç D-GalN'e bağlı karaciğer hasarında TNF- α dışındaki mekanizmaların da etkili olduğunu gösterir (39).

D-GalN'e bağlı akut karaciğer hasarında tipik makroskopik bulgu karaciğerde uniform soluklukla beraber dağınık, subkapsüler hemoraji alanlarının görülmesidir (20).

Histolojik değerlendirmede yaygın hasarlanma, santral ve *intermediate* nekroz, portal ve periportal alanlarda hemoraji ve hepatositin glikojen içeriğinde panlobüler azalma görülür. Lobüler mimari korunmuştur. Fulminan hepatik yetmezlik geliştikten sonra hayatta kalan deney hayvanlarında sitoliz bulgularıyla beraber Kupffer hücrelerinde selüler debriser görülür (2). Hepatositlerde vakuolizasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu vardır (42).

Tek doz subletal D-GalN uygulanması sıçanlarda serum total bilirubin ve ALT düzeylerinde artışla karakterizedir (36). Sıçanlara verilen D-GalN'in nekrojenik dozu 1 g/kg dır. D-GalN'in i.p olarak verilmesinin ardından ALT aktivitesinde yükselme 18. saatte başlar, 24. saatte doruğa erişir (43, 44).

2.3.1. D - Galaktozamin Hepatitinde Apoptozis ve TNF- α

2.3.1.1. Apoptozis

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre lmdr (45). Apoptozise uğrayan hücrelerde görülen değişikliklerin çoğu, intrankleozomal DNA yıkımı ve karakteristik morfolojik değişimlerdir. Bu değişimler değişik hücre içi peptitlerin seçici proteolitik bölünmesini yansıtır. İnankleozomal DNA yıkımı, apoptozisin biyokimyasal işaretidir. Apoptotik kromatin yoğunlaşması, morfolojik değişikliklerin ilk belirtisidir (46). Hücreler özelleşmiş yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek klr, bzsrler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirine yaklaştığı görülür. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdırlar. Bazen ribozomlarda çökme izlenir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Mitokondriler genellikle genel yapılarını korurlar. Apoptotik süreç ilerledikçe sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili kk parçalara bölünür. Bunlara "apoptotik cisim" adı verilir. İlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında ekirdek parçaları da mevcuttur (45). Apoptozise uğrayan hücre, makrofajları uyarmak suretiyle apoptotik cisimlerin fagosite edilmesini sağlamakta ve süreç tamamlanmaktadır (47).

Apoptozis, nekrozdan farklı bir hücre ölümü yoludur; nekroze olan hücrede membran bütünlüğünün kaybolmasını izleyerek, hücre içeriğinin bozulması ve eksudatif inflamasyon gelişmesi söz konusudur. Apoptozis ve nekroz, aynı uyararla aktive olabilmektedir; hücre içi ATP miktarı yeterliyse apoptozis, yetersizse nekroz geliştiği gösterilmiştir (48).

Apoptozis değişik şekildeki sinyallerle harekete geçirilebilir. Bu mekanizmalardan biri sitoplazmada bulunan proteazların aktivasyonudur. Bu proteazlardan en önemlisi Kaspaz (Cas) adı verilen proteaz grubudur. Cas, “*cysteinyl aspartate specific protease*”ın kısaltılmış adıdır. Cas’lar, inaktif proenzim olarak sentezlenirler. Hücre apoptozise başladığında çözünerek aktif enzime dönüşürler (48).

Hücre apoptozisinde, Cas’a bağımlı olmayan yollar da bulunmakla beraber, karakteristik olarak apoptozis, Cas aktivasyonu ve bunun sonucunda oluşan hücre içi özgün proteinler yoluyla meydana gelmektedir (49).

İlaçlar ve kimyasal maddelerin bazıları karaciğerde apoptozisi başlatarak karaciğer hasarına yol açabilirler; dimetilnitrozamin (50), vinblastin, kolşisin, mikrotübül antagonistleri (51) ve asetaminofendir (52). D-GalN ve tiyoasetamid’in (53) *in vivo* apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (31).

Karaciğerde meydana gelen apoptozis *transforming growth faktör* (TGF- β 1), TNF- α gibi sitokinlerin aracılığıyla meydana geldiği saptanmıştır (54).

2.3.1.2. TNF- α

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı olan bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, NO salınımını ve inflamasyonu artırır, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyararak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (55). TNF- α ayrıca, apoptozisin ekstrensek yolağında, özellikle Cas3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi, intrensek apoptozis yolağında da başlangıç Cas’larını aktifleştirmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α ’nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (47).

TNF- α 'nın karaciğer yetmezliği modellerinde sitotoksinite ve hücre proliferasyonuna yol açan ana mediyatör olduğu gösterilmiştir (35).

2.3.1.3. D-Galaktozamine Bağlı Karaciğer Hasarında Apoptozis ve TNF – α

Muntane (27) ve Stachlewitz (56) sıçanlarda D-GalN verilmesinin ardından karaciğerde apoptozis geliştiğini histokimyasal olarak göstermişlerdir. Apoptozisin mekanizmasını açıklamak için Cas3 benzeri proteaz aktivitesi çalışılmış, D-GalN intraperitoneal olarak 1 g/ kg dozunda uygulanmasının ardından 18 ve 24. saatte bakılan Cas3 benzeri proteaz aktivitesi kontrol grubuna göre artmış bulunmuştur (32). Bu enzimin maksimum aktivitesinin D-GalN ile indüklenen karaciğer yetmezliğinde; CC1₄ (34) veya tiyoasetamid verilenlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar D-GalN verilen sıçanlarda apoptozis / nekroz oranının CC1₄ veya tiyoasetamid verilen sıçanlara göre daha fazla olduğunu saptamıştır (43).

D-GalN verilen sıçanlarda apoptozisin yüksek oranda görülmesi D-GalN toksisitesinin kısmen TNF- α aracılığıyla olduğuna işaret etmektedir (27). TNF- α karaciğer hücrelerinde Cas'ları aktive ederek apoptozisi indükler (35, 36). D-GalN'e bağlı karaciğer hasarı artmış TNF- α düzeyleri ile koreledir (27). Hepatositlerde TNF- α düzeylerinin artışı apoptotik cisimciklerde artışla beraberdir (39).

D-GalN ile beraber *Salmonella abortus equi* endotoksini verilerek karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda Cas3 benzeri proteazın selektif olarak aktive olduğu ve bu aktivasyonun karaciğer parankim hücrelerinde apoptozis gelişimi ile korele olduğu gösterilmiştir. Endotoksemi sırasında meydana gelen Cas3 aktivasyonu ve apoptozis *in vivo* TNF- α aracılığıyla gerçekleşir. Cas3 ailesinin efektif bir inhibitörü olan Z-Val-Ala-Asp-CH₂F (Z-VAD) injeksiyonu Cas3 aktivasyonu, apoptozis ve nekrozu engellemiştir (36). D-GalN'e bağlı karaciğer yetmezliğinde anti-TNF- α antikorları ile profilaksi yapılması apoptozis ve nekrozu azaltmıştır (57). TNF- α düzeylerinde artışla karaciğer hasarı arasındaki ilişki alkolik hepatit (40), iskemi ve reperfüzyon sonrasında ve karaciğer transplantasyonu sonrasında allograft rejeksiyonunda da gösterilmiştir (41)

2.4. Probiyotikler

Probiyotikler yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya sağlık kazandıran mikroorganizmalardır. İntestinal flora bakterilerinin protein hidrolizi sonucu oluşturduğu amonyak, aminler, indol gibi maddelerin vücutta intoksikasyona neden olduğu, enerjisini protein hidrolizi yerine karbonhidrat fermentasyonundan sağlayan laktik asit bakterilerinin kullanımının faydalı olduğu 1900'lu yılların başında anlaşılmış olmasına rağmen probiyotik kavramının tanımlanması 20. yüzyılın sonlarında mümkün olmuştur (58). 1989'da Fuller'in yaptığı tanıma göre probiyotik; canlı mikrobial besin olarak konağın florasını düzenleyen, konak için faydalı mikroorganizmalardır (59).

2.4.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda şu özellikler bulunmalıdır: güvenilir olmalı, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalı, sağlıklı insan bağırsağından alınmış olmalı ve stabil olmalıdır. Safra tuzları ve düşük pH gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden barsağına geçebilmelidir. Barsak hücrelerine tutunarak kolonize olabilmelidir. Antimikrobiyal maddeler üretmelidir. Karsinogenik ve patojenik bakterilere antagonistik etki yapmalıdır. Konakçıda hastalıklara direnç gibi yararlı etkiler oluşturabilmelidir. Antibiyotiklere dirençli olmalı, antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda barsak florasını düzenlemek amacı ile kullanılabilirdiğinden, barsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir. Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir. Probiyotikler patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir. Çok suşlu preparatlar olarak hazırlanabilmelidir (60, 61).

2.4.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik üretiminde yaygın olarak kullanılan laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinsine ait türlerdir. Bu mikroorganizmalar karbonhidratları fermente ederek laktik asit oluştururlar. Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer mikroorganizmalar ise *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus*'tur. Her iki grubun etki mekanizmaları ve antibiyotik duyarlılıkları birbirinden farklıdır (62). Sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar Tablo 7'de özetlenmiştir (63).

Tablo 7. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalara örnekler

<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	Mantarlar	Diğerleri
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Saccharomyces cerevisia</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.infant</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>B.longum</i>		<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B.termophilum</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L.reuteri</i>	<i>B.adolescentis</i>		<i>Escherichia coli Nisse 1917</i>
<i>L.bravis</i>	<i>B.lactis</i>		<i>Bacillus clausii</i>
<i>L.cellobisus</i>	<i>B.animalis</i>		<i>Bacillus oligonitrophillus</i>
<i>L.curvatus</i>	<i>B.breve</i>		
<i>L.fermentum</i>			
<i>L.plantarum</i>			
<i>L.rhamnosus</i>			
<i>L.salivarius</i>			
<i>L.gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L.paracasei</i>			
<i>L.helveticus</i>			
<i>L.farciminis</i>			

Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Dec;5(6):596-603'den alınmıştır .

2.4.3. Probiyotiklerin Biyolojik Etkileri

Probiyotikler, konak canlıyı patojenlere karşı koruyarak ve immün sistemini güçlendirerek etki gösterirler. Probiyotiklerin biyolojik etkileri tablo 8'de gösterilmiştir (63).

Tablo 8. Probiyotik bakterilerin biyolojik etkileri

Konak immün cevabının modülasyonu

- Antikor üretimini artırır
- *Natural killer* hücre aktivitesini artırır
- Dentritik hücrelerin fenotip ve fonksiyonlarını düzenler
- NF- κ B ve AP-1 yolaklarını düzenler
- Sitokin salınımını etkiler
- Regülatör T hücrelerini indükler
- PPAR- γ 'yı indükler
- Apoptozisi düzenler
- Proteozom aktivitesini inhibe eder.

Epitelyal bariyer fonksiyonun artırılması

- *Tight junction* protein fosforilasyonunu artırır
- Mukus üretimini artırır
- Epitelyal hücrelerde glikolizasyonu artırır
- sIgA üretimini artırır

Antimikrobiyal etkileri

- Luminal pH'ı düşürür
- Defensin sekresyonunu stimüle eder
- Antimikrobiyal peptidlerin sekresyonunu artırır
- Patojenik bakterilerin invazyonunu önler
- Epitel hücrelerine bakterilerin yapışmasını engeller
- NO salınımını sağlar

Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Dec;5(6):596-603'den alınmıştır.

2.4.4. Probiyotiklerin Antibakteriyel Mekanizması

Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriosin gibi etken maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler (64). Laktobasillusların çoğunun asetik asit ve laktik asit gibi metabolitlerinden ve pH'ı düşürmelerinden dolayı bakteriyel patojenlerin çoğalmasını engellediği in vitro olarak gösterilmiştir. Bazı laktobasiller (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei* Shirota yada *Lactobacillus acidophilus* YIT 0070 suşları) hidrojen peroksit üreterek, *Escherichia coli* 0157:H7 çoğalmasını sınırlanmışlardır (65). *L. Casei subsp. rhamnosus* Lcr35 suşunun süpernatantı insanda patojen olan bakterilerin (enterotoksijenik *E.coli* –ETEC-, enteropatojenik *E. coli* –EPEC-, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Clostridium difficile*) üremesini inhibe etmiştir (66). İnsan sindirim sisteminden izole edilen laktobasillus suşlarının gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olduğu

bilinen dört patojenin (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* ve *C. difficile*) üremesini sınırlandırdığı saptanmıştır (67). *L. casei* GG, in vitro olarak gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çoğuna karşı ‘mikrosin’ adı verilen hücre dışı inhibitör madde üretir (68).

2.4.5. Probiyotiklerin Adezyon Mekanizması

Probiyotikler, barsak mukozasını örterek, patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine temasını azaltır (69). Toksin ve patojenlerin bağlanması engellenmesi, musin gibi konak faktörlerin uyarımı ya da reseptörlere kompetitif bağlanma hipotezinin öne sürülmesine karşın, inhibisyon mekanizması henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (70).

2.4.6. Probiyotiklerin Antiapoptotik Etkisi

Deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan radyasyon kolitinde yoğun probiyotik içeriği olan kefirin proflaktik olarak verilmesinin apoptozis ve Cas3 aktivasyonunu önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (71). Bu etki en belirgin olarak kriptlerde stem hücrelerinin olduğu bölgede izlenmiştir. Kefirin anti-apoptotik etkisi, Cas3 aktivasyonunun inhibe olmasına bağlanmıştır. Diğer taraftan melanoma hücrelerinde ultraviyole ile indüklenen apoptozise karşı kefirin koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmiştir (72).

Fermente süt ürünlerinin, pelvik malignansilerde radyasyon tedavisinden sonra ortaya çıkan kronik barsak rahatsızlıklarını azalttığı da bilinmektedir (73).

2.4.7. Probiyotiklerin Antioksidan Etkisi

Sıçanlarda probiyotiklerle yapılmış bir çalışmada probiyotiklerin D-GalN ile oluşturulmuş karaciğer hasarında hepatosit hasarını, proinflamatuvar sitokinleri ve inflamasyonu azalttığı saptanmıştır (74). Yine başka bir çalışmada probiyotiklerin karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarına karşı süper oksid dismutazı artırarak koruyucu etki gösterdikleri saptanmıştır (75). Kefirle yapılmış bir çalışmada azoksimetan verilerek kolon kriptlerinde anormal formasyon oluşturulan sıçanlarda kefirin GSH gibi antioksidanları arttırdığı saptanmış ve kefirin antioksidan rol oynadığı belirtilmiştir (76).

2.4.8. Probiyotiklerin Immünite Üzerine Etkileri

Probiyotik ürünlerin kullanımında en sık öne sürülen gerekçe, probiyotiklerin immün sistemi düzenleyerek olumlu etki göstermesidir. İn vivo ve in vitro çalışmalar, probiyotiklerin immün cevabı düzenleyebileceğini göstermiştir, fakat altta yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (77). Elimizdeki veriler bize probiyotik bakterilerin immün sistemi endojen konak savunma mekanizmalarını harekete geçirerek modüle ettiğini düşündürmektedir (78).

Probiyotikler *natural killer* (NK) hücre aktivitesini artırarak non-spesifik konakçı yanıtını modüle ederler (79). Sıçanlarda yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan sitokin üretimindeki azalmayı probiyotikler tersine çevirmiştir (80).

Probiyotiklerle ilişkili olarak immün sistemde meydana gelen değişiklikler; mukus üretiminin indüksiyonu, laktobasillerin sinyalizasyonu yoluyla makrofaj aktivasyonu, sekretuar IgA ve nötrofillerde artma, inflamatuvar sitokin salınımının inhibisyonu, periferel Ig düzeylerinin artışıdır (81).

Probiyotikler dentrik hücrelerde yüzey fenotipini değiştirerek sitokin salınımına neden olur (82). Bununla beraber bu etkilerin lokalize mi sistemik mi olduğu net değildir. Bu etkilerin hastalarla sağlıklı insanlar arasında farklı olup olmadığı, ya da tüm probiyotiklerin böyle etkileri olup olmadığı halen bilinmemektedir. Sağlıklı bireylerde probiyotiklerin immün sistem üzerine gösterdiği regülatör etki, hastalarda görülmeyebilir. Örneğin sağlıklı bireyde probiyotikler fagositoz üzerinde stimulatör etki göstermesine rağmen, allerjisi olan bireylerde fagositozda *down regülasyona* neden olur (83). Probiyotiklerin immün sistemdeki etkilerini anlamak için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

2.4.9. Sağlıklı Bireyde Probiyotik Kullanımı

Pek çok probiyotik ürün sağlıklı bireyler tarafından kullanılmaktadır. Sindirim sisteminin düzenlenmesi, genel iyilik halinin sağlanması, uzun dönemde olumlu gastrointestinal, respiratuvar veya kardiyak etki göstermesi inanişıyla giderek artan sayıda insan bu ürünleri düzenli olarak tüketmektedir. Bununla beraber probiyotiklerin uzun dönem kullanımının sağlıklı kalmaya yardımcı olduğunu ispatlamış bir çalışma yoktur. İlave olarak probiyotiklerin sağlıklı kişilerde immün sistem üzerine etkilerinin

kesin bir ölçütü yoktur. Probiyotik alımının sağlıklı yaşam için önerilen diyet, egzersiz veya stresin azaltılması ile karşılaştırıldığında ek avantajı olup olmadığının değerlendirilmesi gerekir (84).

2.4.10. Probiyotiklerin Güvenilirliği

Probiyotik bakterinin büyük miktarlarda canlı olarak alınması ve yararlı etkilerinin ortaya çıkması için belli bir dönem boyunca kullanılmasının gerekmesi nedeniyle probiyotiklerin güvenilirliği çok önemlidir.

Probiyotiklerin geleneksel olarak kullanımı (örneğin yiyeceklerin işlenmesinde kullanılan laktobasiller) sırasında herhangi bir yan etki görülmemiştir.

Son yıllarda enterokok ve bazı sakkaromiçes suşları ile ortaya çıkan izole oportunistik infeksiyon vakaları bildirilmiştir. Bu vakalar enterokoklara bağlı nazokamial enfeksiyonların son zamanlarda artış göstermesi ve antibiyotik direncinin giderek artması ile de ilişkili olabilir. Belirli enterokok suşları yıllardır süt ürünlerinin fermentasyonunda kullanılmakta ve güvenli kabul edilmektedir (84).

FAO/WHO kullanılacak probiyotik suşlarının bazı parametreler açısından değerlendirilmesi gerektiğini önermiştir. Bu parametreler; antibiyotik duyarlılığı, toksin üretimi, metabolik ve hemolitik aktiviteler, immunkompromize hayvan modellerinde infektivitenin ve yan etkilerinin değerlendirilmesi, insanlarda görülen yan etkilerdir (84).

2.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri (SOR), hücre metabolizmasında ortaya çıkan, en dış tabakalarında eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğiliminde olan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller hücrede lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi önemli bileşik ve hücre yapılara etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir. Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres”, sonuçta bozulan hücre metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını getirir (85). İnsan vücudunda serbest radikal denilince serbest oksijen radikalleri akla

gelmektedir. Antioksidan savunma mekanizmaları ile serbest radikal oluşumunu hızlandıran etkenler arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkar. Karaciğer detoksifikasyon için serbest radikalleri kullanırken, nötrofiller patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretebilir. Nötrofillerin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, serbest oksijen radikalleri, NO sentaz gibi enzimler; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), NO ve hidroklorik asit gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (86). Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara da yol açtığı bilinmektedir (87). Kansere, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus gibi birçok hastalıkta oksidatif hasarın rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif hasar hastalığın başlangıcında veya patogenezinde rol oynuyorsa başarılı antioksidan tedavi hastalığı önleyebilir veya seyrini hafifletebilir.

2.5.1. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.5.1.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara lipid peroksidasyonu denilmektedir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (88). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni MDA'dır. Bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (89). MDA'nın kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijen radikallerinin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur.

2.5.1.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı protein ve nükleik asitler, poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturuca zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (90).

2.5.2. Nonenzimatik ve Enzimatik Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılabilirler.

2.5.2.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

GSH düzeyindeki azalma, oksidatif stresin yoğunluğunu yansıtır. Redükte GSH/okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. GSH ve GSSG “high performance lipid chromatography” (HPLC) ve spektrofotometrik yöntemlerle tesbit edilir (91). GSH karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip onları zararsız ürünlere çevirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (92). Diğer önemli nonenzimatik antioksidanlar; S-adenozilmetionin (93), E vitamini, C vitamini, seruloplazmin, ürik asit, albumin, bilirubin, β -karoten (94), glukoz (95), piruvat (96), taurin (97), melatonin (98), transferin (99), sisteindir (88).

2.5.2.2. Enzimatik Antioksidanlar

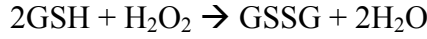
Başlıca antioksidan enzimler; GSH-Px, CAT ve SOD'dur (92).

2.5.2.2.1. Glutatyon Peroksidaz

GSH-Px yapısında, bir metal olan selenyum bulunmaktadır. Bu enzim, redükte glutatyonun okside glutatyonla çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda

H₂O₂'i yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir. GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimi H₂O₂'i suya indirger. Daha sonra GSH redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (92). Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonda olması durumunda GSH-Px, CAT enzimine göre daha etkilidir (100).

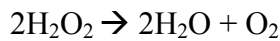
Reaksiyon şu şekildedir:



2.5.2.2.2. Katalaz

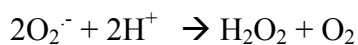
CAT enzimi, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Özellikle hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (100). Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokusunda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (101). Okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksiti direkt olarak suya dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (102). CAT ve GSH-Px enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkili iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir.

CAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



2.5.2.2.3. Süperoksid Dismutaz

Süperoksid radikallerinin hidrojen peroksite dönüşmesini katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



SOD enzimi metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundandır. Hücreyi radikallerin etkisinden koruyan savunma mekanizması arasında SOD enzimi ilk rolü oynar. SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün birikimi CAT enzimi tarafından önlenmektedir (103).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada, sıçanlarda D-GalN ile uyarılan akut karaciğer hasarında, değişik probiyotik bakteri suşlarının etkinliğini araştırmayı amaçladık. Deneyde kullanılan malzemeler Tablo 9 ve Ek 1’de gösterilmiştir.

Tablo 9. Kullanılan malzeme ve aletler

1	Soğutmalı santrifüj	(Eppendorf MR 5415, Almanya)
2	Derin dondurucu	(Facis, Fransa)
3	Hassas terazi	(Scaltec, İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	(Nüve NM 100, Türkiye)
5	Otomatik pipetler	(Gilson, Fransa), (Eppendorf MR 5415, Almanya)
6	UV spektrofotometre	(Shimadzu UV 1601, Japonya)
7	Homojenizatör	(Ultra Turrax T25, Almanya)
8	MDA	Immundiagnostic AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim Germany, KC: 1900-070709
9	TNF- α	BioSource International Inc. 542 Flynn Road, Camarillo, California, 93012 USA (Immunoassay Kit), KRC3011
10	D-Galaktozamin	Sigma Chemicals. Co., St Louis, MO, USA

3.1.1. Yöntem

Çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu’na onaylandı ve tüm çalışma boyunca etik kurallara uyuldu.

İki deney protokolü uygulandı. Her protokolda 200 - 250 gram ağırlığında, 48’er adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Deneyler süresince sıçanlar, bir kafeste 4’er sıçan olacak şekilde tutuldular. Deneyler, sıçanlar laboratuvara geldikten sonraki bir haftalık uyum sürecinin ardından başlatıldı. Deney süresince hayvanlar standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) tutuldu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

3.1.2. Probiyotiklerin Hazırlanması

Araştırmada *Lactobacillus fermentum* AB-5, *Lactobacillus plantarum* BK9-40, AK6-120 *Enterococcus saccharolyticus* BK13-53, AK7-31, *Enterococcus malodaratus* AK7-32, *Lactobacillus rhamnosus* AK6-180, AB20-100, AK6-27, AC18-82'den oluşan toplam 10 suş probiyotik kullanılmıştır. Bu bakteriler Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında izole edilmiştir. İzolatların bazı probiyotik özellikleri belirlenmiştir (104). Bakterilerin tür düzeyinde tanıları 16S rRNA dizi analizleri ile gerçekleştirilmiştir (105). Probiyotik suşlarının hazırlanması sırasında her bir izolattan ml'de 1×10^9 bakteri olacak şekilde hacmi ayarlanmış MRS sıvı besiyerine, %1'lik inokülasyon yapıp anaerob ortamda 37° C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında sıvı kültürler falkon tüplerine aktararak hücre pelletlerinin elde edilmesi için 5000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatant kısmı atılarak PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Her bir probiyotik suşu bir sıçanın günlük oral alımı olan 0,2 ml skim milk besiyerinde 1×10^9 hücre olacak şekilde süspanse edilmiştir. Skim milk içinde hazırlanan canlı bakteri süspanسیونları steril cam tüplere dağıtılıp üzeri parafinle kapatılarak -80° C'de kullanım için saklanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Deney Protokolleri

3.2.1.1. Deney 1 Protokolü

İlk deneyin amacı D-GalN'le uyarılan aspartat aminotransferaz (AST) ve ALT yükselmesini en fazla engelleyen probiyotik suşlarını belirlemektir. Deneyde toplam 48 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 4'er adet olmak üzere 12 gruba ayrıldı. İlk 10 gruba farklı probiyotik suşları verildi, son iki grup ise kontrol grubu olarak ayrıldı.

Grup 1 (*Lactobacillus fermentum* AB5-18/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus fermentum* AB5-18 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM (skimmilk) içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml serum fizyolojik (SF) içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 2 (*Lactobacillus pantarum* BK9-40/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus pantarum* BK9-40 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 3 (*Lactobacillus plantarum* AK6-120/D-GalN): İlk yedi gün orogastrik yolla *Lactobacillus plantarum* AKG-120 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 4 (*Lactobacillus rhamnosus* AK6-180/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus rhamnosus* AKG-180 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 5 (*Lactobacillus rhamnosus* AB20-100/D-GalN): İlk yedi gün orogastrik yolla *Lactobacillus rhomnosus* AB20-100 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 6 (*Lactobacillus rhamnosus* AK6-27/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus rhamnosus* AKG-27 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 7 (*Lactobacillus rhamnosus* AC18-82/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus rhamnosus* AC18-82 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 8 (*Enterococcus saccharolyticus* AK7-31/D-GalN): İlk yedi gün *Lactobacillus rhamnosus* AKG-180 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 9 (*Enterococcus malodaratus* AK7-32/ D-GalN): İlk yedi gün *Enterococcus malodaratus* AK7-32 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 10 (*Enterococcus saccharolyticus* BK13-53/D-GalN): İlk yedi gün *Enterococcus saccharolyticus* BK13-53 suşu günde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspanse edilerek orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 11 (SM/D-GalN): Temel kontrol grubu olan bu grupta ilk yedi gün 0,2 ml SM, orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak enjekte edildi.

Grup 12 (SM/SF): Yedi gün boyunca orogastrik yolla 0,2 ml SM, orogastrik yolla verildi. Yedinci gün ön tedavi materyali verildikten sonra i.p yolla SF (D-GalN volmüne ml/kg eşit olacak şekilde) enjekte edildi.

Tablo 10. Deney protokolü 1

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
Grup 1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1	PB1/D-GalN	EX
Grup 2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2	PB2/D-GalN	EX
Grup 3	PB3	PB3	PB3	PB3	PB3	PB3	PB3/D-GalN	EX
Grup 4	PB4	PB4	PB4	PB4	PB4	PB4	PB4/D-GalN	EX
Grup 5	PB5	PB5	PB5	PB5	PB5	PB5	PB5/D-GalN	EX
Grup 6	PB6	PB6	PB6	PB6	PB6	PB6	PB6/D-GalN	EX
Grup 7	PB7	PB7	PB7	PB7	PB7	PB7	PB7/D-GalN	EX
Grup 8	PB8	PB8	PB8	PB8	PB8	PB8	PB8/D-GalN	EX
Grup 9	PB9	PB9	PB9	PB9	PB9	PB9	PB9/D-GalN	EX
Grup 10	PB10	PB10	PB10	PB10	PB10	PB10	PB10/D-GalN	EX
Grup 11	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM/ D-GalN	EX
Grup 12	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM/SF	EX

PB1: *Lactobacillus fermentum* AB5-18, PB2: *Lactobacillus plantarum* BK9-40, PB3: *Lactobacillus plantarum* AK6-120, PB4: *Lactobacillus rhamnosus* AK6-180, PB5: *Lactobacillus rhamnosus* AB20-100, PB6: *Lactobacillus rhamnosus* AK6-27, PB7: *Lactobacillus rhamnosus* AC18-82, PB8: *Enterococcus saccharolyticus* AK7-31, PB9: *Enterococcus malodarus* AK7-32, PB10: *Enterococcus saccharolyticus* BK13-53, D-GalN: D-galaktozamin SM: Skimmilk, SF: Serum fizyolojik, EX: Sakrifikasyon

3.2.1.1.1. Kan ve Doku Örneklerin Alınması

D-GalN enjeksiyonundan 24 saat sonra tedavinin 8. gününde, sıçanlar saat 09:00 ile 10:00 arasında i.p ketamin 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg ile anesteziye edilerek, mid-line insizyonla batınları açıldı ve vena cava inferiordan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve aynı gün serum AST ve ALT aktiviteleri çalışıldı.

3.2.1.2. Deney 2 Protokolü

Deney 1'de kullanılan 10 probiyotik suşundan AST ve ALT aktivitesinin yükselmesini en fazla engelleyen iki probiyotik suşu (*L. plantarum* BK9-40 ve *E. malodarus* AK7-32) Deney 2'de kullanılmıştır. Deney 2'de her grupta 8'er sıçan olmak üzere 48 adet sıçan kullanılmıştır. 3 tane kontrol grubu olmak üzere toplam 6 grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (Normal kontrol (N.Kontrol)): Bu gruba 7 gün boyunca 0,2 ml SM, orogastrik yolla verildi. 7. gün sabah SM verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında i.p 0,2 ml SF enjekte edildi.

Grup 2 (Lb. Kontrol): Bu gruba 7 gün boyunca *L. plantarum* BK9-40 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspansedilerek orogastrik yolla verildi. 7. gün sabah probiyotik verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında i.p 0,2 ml SF enjekte edildi.

Grup 3 (E. Kontrol): Bu gruba 7 gün boyunca *E. malodoratus* AK7-32 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspansedilerek orogastrik yolla verildi. 7. gün sabah probiyotik verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında i.p 0,2 SF enjekte edildi.

Grup 4 (D-GalN): Bu gruba 7 gün boyunca orogastrik olarak 0,2 ml SM orogastrik yolla verildi 7. gün sabah SM verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak i.p enjekte edildi.

Grup 5 (Lb./D-GalN): Bu gruba 7 gün boyunca *L. plantarum* BK9-40 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspansedilerek verildi. 7. gün sabah probiyotik verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak i.p enjekte edildi.

Grup 6 (E./D-GalN): Bu gruba 7 gün boyunca *E. malodoratus* AK7-32 içinde 1×10^9 hücre olacak şekilde 0,2 ml SM içinde süspansedilerek verildi. 7. gün sabah probiyotik verildikten sonra saat 09:00-10:00 arasında 1g/kg dozunda D-GalN 0,2 ml SF içinde sulandırılarak i.p enjekte edildi.

Tablo 11. Deney protokolü 2

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
Grup 1:N.Kontrol	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM/SF	EX
Grup 2:Lb.Kontrol	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb./SF	EX
Grup 3:E.Kontrol	E.	E.	E.	E.	E.	E.	E./SF	EX
Grup 4:D-GalN	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM/ D-GalN	EX
Grup 5: Lb./DGalN	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb.	Lb./D-GalN	EX
Grup 6:E./D-GalN	E.	E.	E.	E.	E.	E.	E./D-GalN	EX

Lb.:*Lactobacillus pantarum* BK9-40, E.: *Enterococcus malodoratus* AK7-32, SF: Serum fizyolojik, D-GalN: D-Galaktozamin, SM: Skimmilk, EX: Sakrifikasyon

3.2.1.2.1. Kan ve Doku Örneklerin Alınması

D-GalN enjeksiyonundan 24 saat sonra, sıçanlar i.p ketamin 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg ile anesteziye edildi, servikal dekapitasyondan sonra steril şartlarda mid-line insizyonla batınları açıldı. Vena cava inferiordan alınan kan örnekleri, 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve -80 °C'de biyokimyasal incelemeler yapılncaya kadar saklandı. Histopatolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik inceleme için steril şartlarda sıçanların karaciğer ve dalakları çıkartıldı. Histopatolojik inceleme için doku örnekleri %10 formaldehit içinde saklandı. Biyokimyasal incelemeler için alınan örnekler hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve Eppendorf tüplerinin içine yerleştirilerek biyokimyasal çalışmalar yapılana kadar -80°C'de saklandı.

Karaciğer kaudat lobu ve dalaktan alınan örnekler bakteriyolojik traslokasyonun değerlendirilmesi için standard yöntemlerle aerobik ve anaerobik bakteri kültürleri yapıldı.

3.2.1.2.2. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması

3.2.1.2.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Karaciğer dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7,4 olan 0,05 M PBS kullanıldı (88).

3.2.1.2.2.2. Homojenizasyon

Homojenizasyon işlemi başlangıcında karaciğer dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16 000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Daha sonra buz dolu plastik kaplar içinde 30 saniye sonifikasyon yapıldı. Homojenatlar; ısısı arttırılmadan, 5 000 devir/dakika hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantları eppendorf tüplerine kondu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi. Ayrılan süpernatantlardan GSH, GSH-Px, CAT, SOD, MDA, TNF- α , NO enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

3.2.1.2.3. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Biyokimyasal analizler Süleyman Demirel Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek için;

- ALT, AST ve Alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri Abbot Aeroset (USA) otoanalizöründe kolorimetrik olarak çalışıldı.
- Karaciğer oksidatif stresini değerlendirmek için, karaciğer homejenatında MDA seviyesinin tayini Mateos ve arkadaşlarının dinitrofenilhidrazin ile türevleme esasına dayanan HPLC metodu kullanılarak ölçüldü (106).
- SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (107),
- CAT enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (108),
- GSH-Px enzim aktivitesi Paglia metoduna göre çalışıldı (109).
- GSH konsantrasyonu Ellman reaktifi kullanılarak Beutler ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemlere göre yapıldı (110) .
- Karaciğer dokusunda NO ve TNF- α ELİZA ile çalışıldı.
- Doku protein konsantrasyonu, otoanalizör ile Lowry Metoduna göre ticari kitle çalışılmıştır (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, California, USA) (111).

3.2.1.2.4. Histolojik Değerlendirme

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri % 10'luk formaldehit kullanılarak fikse edildi. Parafin bloklar oluşturuldu. Oluşturulan parafin bloklardan 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400 büyütmede) incelendi.

Hepatosellüler hasar derecesi İshak ve ark.'nın (112) tanımladığı skorlama sistemi kullanılarak yapıldı. Bu skorlama sistemine göre hepatosellüler hasar derecesi aşağıda verilen her birim için 0-6 arasında skorlanıp toplam skor elde edilerek hesaplandı.

Periportal veya periseptal interface hepatit	Skor
Yok	0
Hafif (fokal, birkaç portal alan, <%50)	1
Hafif/Orta (fokal, çoğu portal alan, >%50)	2
Orta (septa veya alanların çevresinin %50'sinden azında devamlı)	3
Ciddi (septa veya alanların çevresinin %50'sinden fazlasında devamlı)	4

Birleşen nekroz	Skor
Yok	0
Fokal birleşen nekroz	1
Bazı alanlarda zon 3 nekrozu (lobüllerin %50'sinden azında)	2
Bazı alanlarda zon 3 nekrozu (lobüllerin %50'sinden fazlasında)	3
Zon 3 nekrozu + nadir portal santral köprüleşme (≤ 2)	4
Zon 3 nekrozu + çok sayıda portal santral köprüleşme (>2)	5
Panasiner veya multiasiner nekroz	6

Fokal litik lezyon, apoptoz ve fokal inflamasyon	Skor
Yok	0
Onluk büyütme alanında ≤ 1 odak	1
Onluk büyütme alanında 2-4 odak	2
Onluk büyütme alanında 5-10 odak	3
Onluk büyütme alanında >10 odak	4

Portal inflamasyon	Skor
Yok	0
Portal alanların tümünde veya bazılarında hafif	1
Portal alanların tümünde veya bazılarında orta	2
Portal alanların tümünde orta/belirgin	3
Portal alanların tümünde belirgin	4

3.2.1.2.5. Bakteri Kültürleri

Bakteriyel translokasyonun değerlendirilmesi için her gruptan rastgele seçilen 3'er adet sıçanların steril şartlarda karaciğer kaudat lobu ve dalaktan alınan örneklerle standard yöntemlerle aerobik ve anaerobik bakteri kültürleri yapıldı.

3.2.1.2.6. İstatistik Değerlendirme

Çalışmanın analizi SPSS 11.0 istatistik programında yapıldı; Ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma ile gösterilmiştir. Gruplar arası farklılaşmasının önemi tek yönlü ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa Post Hoc Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Deney grupları arasındaki immunhistokimyasal skorların farklılığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney u testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney 1

4.1.1. Deney 1'deki Karaciğer Fonksiyon Testleri Aktiviteleri

İlk deneyin amacı farklı probiyotikleri vererek D-GalN'ın uyardığı AST ve ALT yükselmesini en fazla engelleyen 2 probiyotik suşunu ikinci deney için seçmektir.

SM/SF grubu ALT aktiviteleri, PB1/D-GalN, PB6/D-GalN, SM/D-GalN gruplarına göre anlamlı derecede düşük saptandı (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$).

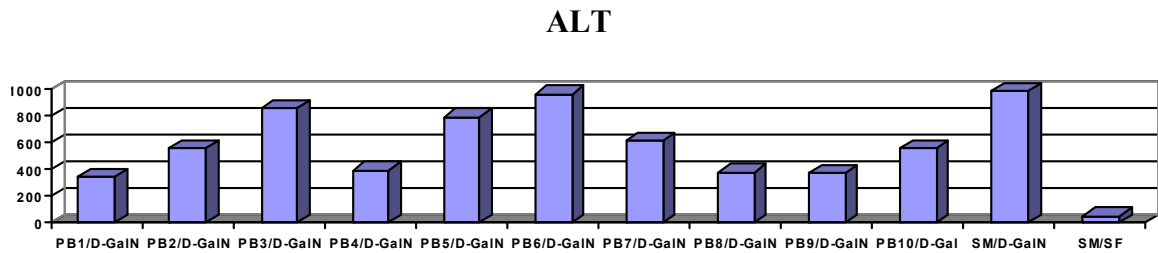
SM/SF grubu AST aktiviteleri, PB1/D-GalN, PB4/D-GalN, PB7/D-GalN, PB8/D-GalN gruplarına göre anlamlı derecede düşük saptandı (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$, $p<0,05$, $p<0,001$).

Deney 1 sonucunda elde edilen ALT ve AST aktiviteleri Tablo 11'de, ALT aktiviteleri Şekil 1'de, AST aktiviteleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

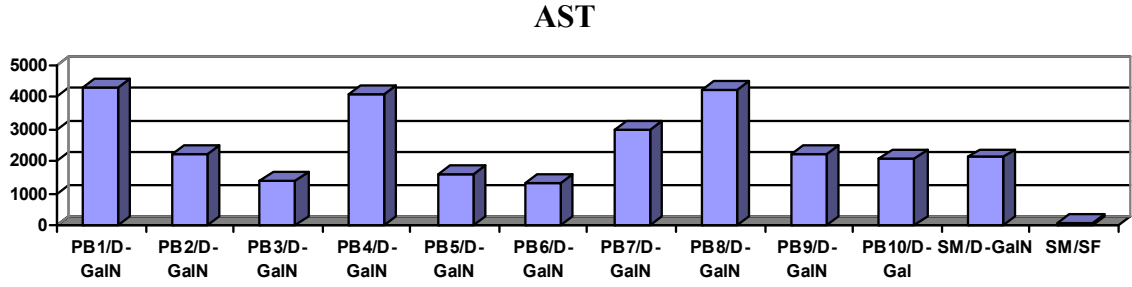
Tablo 12. Deney 1 çalışma gruplarında ALT ve AST aktiviteleri

Gruplar	ALT (U/L)	AST (U/L)
Grup1: PB1/D-GalN	339,75 ± 158,14	4306,60 ± 1065,85
Grup 2: PB2/D-GalN	554,60 ± 196,09	2218,40 ± 430,03
Grup3:PB3/D-GalN	850,60 ± 186,60	1415,80 ± 349,21
Grup4:PB4/D-GalN	391,75 ± 260,50	4124,40 ± 987,07
Grup5:PB5/D-GalN	791,80 ± 209,22	1583,80 ± 353,53
Grup6:PB6/D-GalN	959,60 ± 62,46	1309,00 ± 189,43
Grup7:PB7/D-GalN	617,25 ± 166,42	2981,40 ± 794,32
Grup8:PB8/D-GalN	377,34 ± 248,56	4248,60 ± 779,37
Grup9:PB9/D-GalN	374,60 ± 98,07	2236,60 ± 278,86
Grup10:PB10/D-GalN	555,00 ± 127,96	2069,20 ± 368,91
Grup11:SM/D-GalN	984,00 ± 96,34	2119,40 ± 240,78
Grup12:SM/SF	54,40 ± 4,96	93,80 ± 5,01
P (ANOVA)	<0.05	<0.001
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)	12-1: <0,05 12-6: <0,01 12-11: <0,05	12-1: <0,001 12-4: =0,001 12-7: <0,05 12-8: <0,001
PB1: <i>Lactobacillus fermentum</i> AB5-18, PB2: <i>Lactobacillus pantarum</i> BK9-40, PB3: <i>Lactobacillus plantarum</i> AK6-120, PB4: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> AK6-180, PB5: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> AB20-100, PB6: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> AK6-27, PB7: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> AC18-82, PB8: <i>Enterococcus saccharolyticus</i> AK7-31, PB9: <i>Enterococcus malodaratus</i> AK7-32, PB10: <i>Enterococcus saccharolyticus</i> BK13-53, SM: Skimmilk, SF: Serum fizyolojik		

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 1. Serum ALT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 2. Serum AST aktivite dağılımı

4.2. Deney 2

Deney 1’de kullanılan 10 probiyotik suşundan AST ve ALT aktivitesinin yükselmesini kısmen engelleyen iki probiyotik suşu *Lb. plantarum* (Lb.) BK9-40 ve *E. malodaratus* (E.) AK7-32 Deney 2’de kullanılmıştır.

4.2.1. Sıçanlardaki Ağırlık Değişiklikleri

Normal Kontrol grubunda sıçanların kiloları artış gösterirken diğer tüm grupların ağırlık değişimi yüzdesinde azalma gözlemlendi.

Sıçanların çalışma öncesi ve çalışma sonrası ortalama ağırlıkları ile % olarak ağırlık değişimleri Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13. Çalışma başlangıcı ve sakrifikasyon öncesi sıçanların ortalama ağırlıkları

Gruplar	Çalışma öncesi (gr)	Çalışma sonrası (gr)	Ağırlık değişimi (%)
Grup1:N. Kontrol	237,63 ± 5,12	246,75 ± 6,67	3,76 ± 0,81
Grup2:Lb. Kontrol	235,50 ± 4,28	235,12 ± 4,43	-0,14 ± 0,85
Grup3:E. Kontrol	245,63 ± 3,88	239,25 ± 7,80	-2,75 ± 1,98
Grup4:D-GalN	240,50 ± 2,54	237,50 ± 1,87	-1,21 ± 0,68
Grup5:Lb./D-GalN	245,50 ± 2,99	234,37 ± 3,52	-4,53 ± 0,70
Grup6:E./D-GalN	244,87 ± 4,10	240,75 ± 4,37	-1,09 ± 0,56
P (ANOVA)	ns	ns	<0,001
P (Post hoc Tukey test)			4-1:<0,05 5-1: <0,001 6-1: <0,05

4.2.2. Sıçanlardaki Karaciğer Ağırlık Değişiklikleri

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğer ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü. Karaciğer ağırlığı vücut ağırlığına oranlanarak bu değişim % olarak ifade edildi.

D-GalN grubunda karaciğer ağırlığı, N. Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre düşüktü (sırasıyla $<0,05$, $p<0,05$, $p<0,001$).

Lb./D-GalN grubunda karaciğer ağırlığı, N. Kontrol ve E. Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$).

E./D-GalN grubunda karaciğer ağırlığı, N.Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol grubuna göre düşüktü (tümü $p<0,001$).

D-GalN grubunda karaciğer/vücut ağırlığı oranı, N. Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre düşüktü (sırasıyla $<0,05$, $p<0,05$, $p<0,01$).

Lb./D-GalN grubunda karaciğer/ vücut ağırlığı oranı, N. Kontrol ve E. Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$).

E./D-GalN grubunda karaciğer/vücut ağırlığı oranı, N. Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol grubuna göre düşüktü (tümü $p<0,001$).

Karaciğer ağırlıkları ve karaciğer/ vücut ağırlığı oranları Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. Sıçanlardaki karaciğer ağırlık değişiklikleri

Gruplar	Karaciğer ağırlığı (gr)	Karaciğer/vücut ağırlığı oranı (%)
Grup1:N. Kontrol	9,71 ± 0,99	3,93 ± 0,08
Grup2:Lb. Kontrol	9,20 ± 1,23	3,90 ± 0,15
Grup3:E. Kontrol	9,73 ± 1,60	4,04 ± 0,13
Grup4:D-GalN	8,02 ± 0,65	3,37 ± 0,08
Grup5:Lb./D-GalN	8,02 ± 0,65	3,45 ± 0,07
Grup6:E./D-GalN	7,42 ± 0,64	3,09 ± 0,12
P (ANOVA)	<0,001	<0,001
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)	4-1: <0,05 4-2: <0,05 4-3: <0,001 5-1: <0,05 5-3: <0,001 6-1: <0,001 6-2: <0,001 6-3: <0,001	4-1: <0,05 4-2: <0,05 4-3: <0,01 5-1: <0,05 5-3: <0,01 6-1: <0,001 6-2: <0,001 6-3: <0,001

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

4.2.3. Karaciğer Fonksiyon Testleri Aktiviteleri (AST, ALT, ALP)

Serum AST aktivitesi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarında benzerdi.

D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN gruplarındaki AST aktiviteleri, Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$).

D-GalN alan grupta serum ALT aktivitesi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (tümü $p<0,05$).

E./D-GalN alan grupta serum ALT aktivitesi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,05$).

D-GalN alan grupta ALP aktivitesi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p<0,05$, $p=0,01$).

Lb./D-GalN alan grupta ALP aktivitesi, Normal Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$).

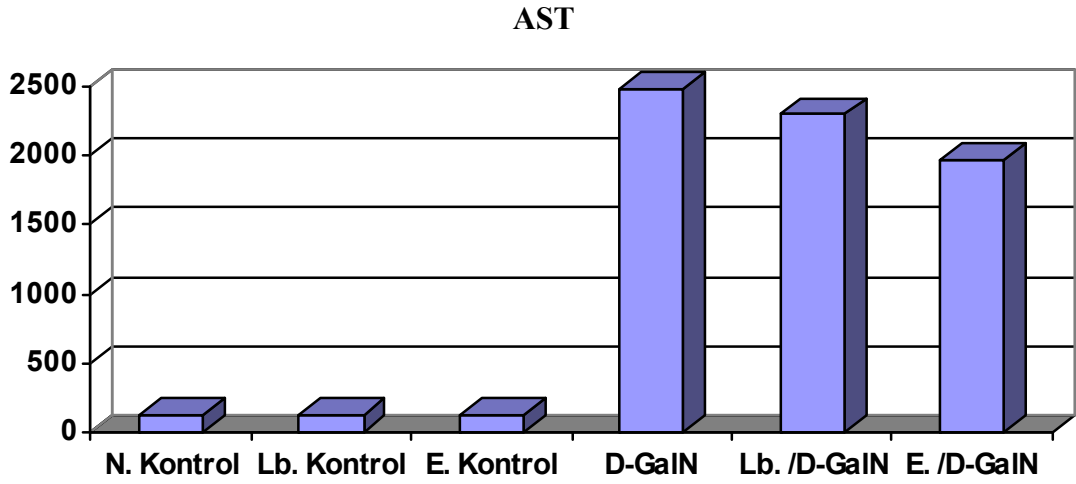
E./D-GalN alan grupta ALP aktivitesi, Lb. Kontrol, E. Kontrol gruplarına göre yüksek saptandı ($p<0,05$).

Tablo 15 ve Şekil 3 ve 4'te deney gruplarındaki AST, ALT ve ALP aktiviteleri, sunulmuştur.

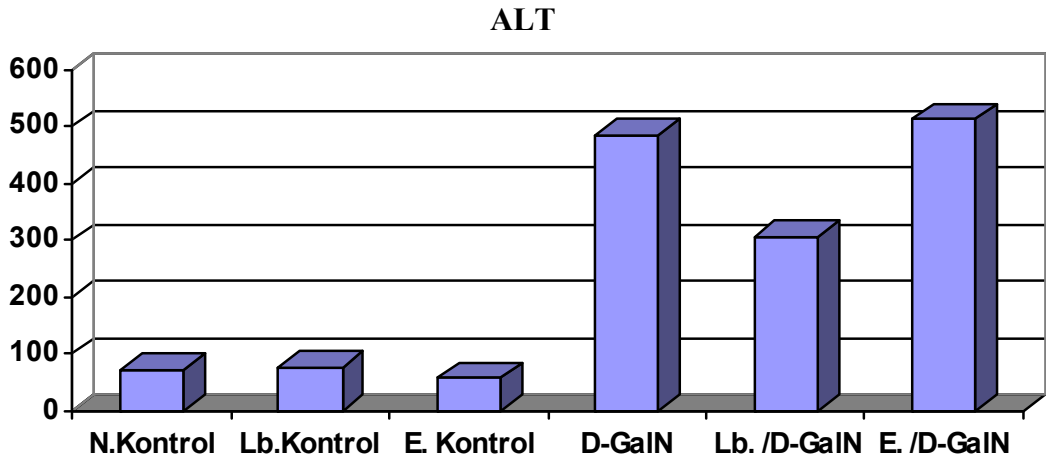
Tablo 15. Deney 2 karaciğer fonksiyon testleri aktiviteleri

Gruplar	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
Grup1:N. Kontrol	126,38 ± 8,45	71,63 ± 5,11	236,50 ± 33,28
Grup2:Lb. Kontrol	130,29 ± 8,78	76,38 ± 10,95	226,75 ± 34,28
Grup3:E. Kontrol	123,00 ± 7,17	58,00 ± 2,49	328,25 ± 65,17
Grup4:D-GalN	2473,75 ± 451,27	482,83 ± 133,11	455,88 ± 30,73
Grup5:Lb./D-GalN	2294,25 ± 336,00	305,43 ± 119,72	435,38 ± 37,92
Grup6:E./D-GalN	1965,00 ± 323,99	512,25 ± 132,03	396,38 ± 57,35
P (ANOVA)	<0,001	<0,01	=0,01
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)	4-1: <0,001 4-2: <0,001 4-3: <0,001 5-1: <0,001 5-2: <0,001 5-3: <0,001 6-1: <0,001 6-2: <0,001 6-3: <0,001	4-1: <0,05 4-2: <0,05 4-3: <0,05 6-1: <0,01 6-2: <0,01 6-3: <0,01	4-1: <0,05 4-2: =0,01 5-1: <0,05 5-2: <0,05 6-2: <0,05

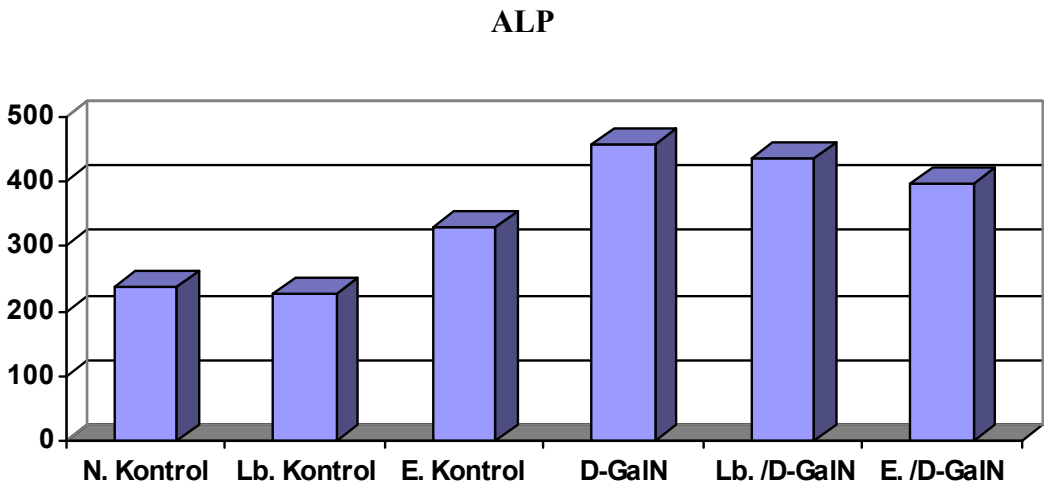
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 3. Serum AST aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. Serum ALT aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 5. Serum ALP aktivitesinin gruplara göre dağılımı

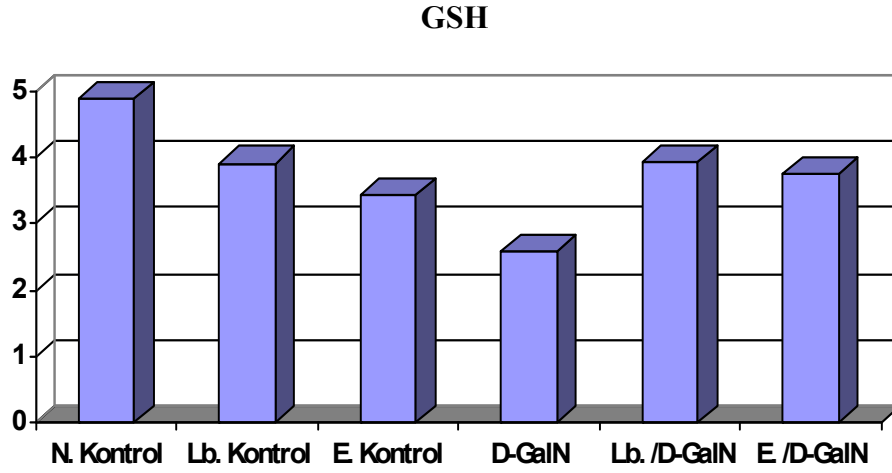
4.2.4. Karaciğer Dokusunda GSH Düzeyleri

GSH düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Tablo 16'da ve Şekil 6'da deney gruplarındaki GSH düzeyleri sunulmuştur.

Tablo 16. Karaciğer dokusunda GSH düzeyleri

Gruplar	GSH (mg/gr protein)
Grup1:N. Kontrol	4,89 ± 1,21
Grup2:Lb. Kontrol	3,91 ± 0,70
Grup3:E. Kontrol	3,44 ± 0,23
Grup4:D-GalN	2,58 ± 0,15
Grup5:Lb./D-GalN	3,94 ± 0,21
Grup6:E./D-GalN	3,75 ± 0,50
P (ANOVA)	ns

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 6. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.2.5. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Düzeyleri (CAT, SOD, GSH-Px)

CAT düzeylerinde gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık gözlenmedi.

D-GalN grubundaki karaciğer doku SOD düzeyi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol, Lb./D-GalN ve E./D-GalN gruplarına göre anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,01$).

Lb./D-GalN grubundaki karaciğer doku SOD düzeyi, Normal Kontrol ve Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$, $p<0,05$, $p<0,001$).

E./D-GalN grubundaki karaciğer doku SOD düzeyi, Normal Kontrol ve Lb. Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$, $p<0,05$).

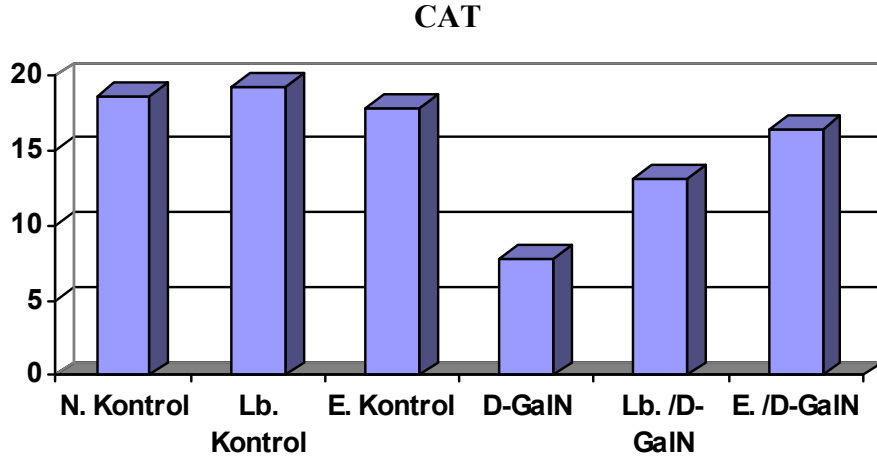
GSH-Px düzeyinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Tablo 17 ve Şekil 7, 8 ve 9'da deney grupları arasındaki antioksidan enzim CAT, SOD, GSH-Px düzeyleri sunulmuştur.

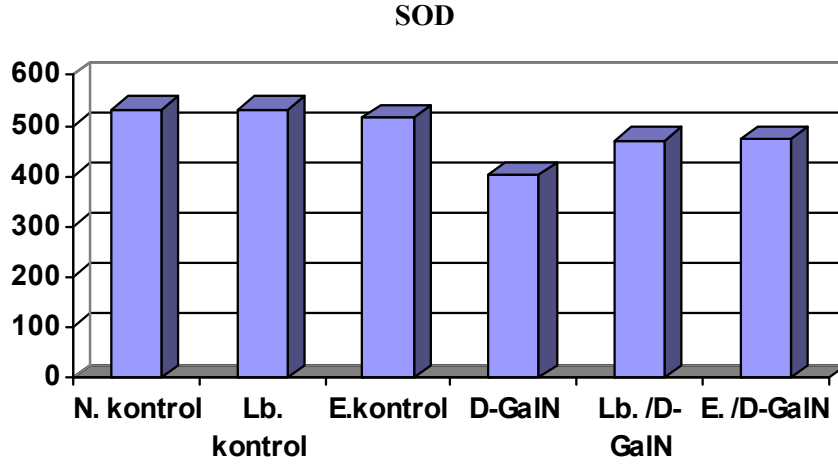
Tablo 17. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri (CAT, SOD, GSH-Px)

Gruplar	CAT (katal/gr protein)	SOD (U/gr protein)	GSH-Px (U/gr protein)
Grup1:N. Kontrol	18,68 ± 2,47	531,80 ± 8,29	110,44 ± 9,06
Grup2:Lb. Kontrol	19,33 ± 2,70	531,71 ± 14,58	111,00 ± 18,02
Grup3:E. Kontrol	17,82 ± 4,12	514,97 ± 17,37	113,30 ± 12,58
Grup4:D-GalN	7,83± 3,02	401,60 ± 10,95	77,82 ± 16,71
Grup5:Lb./D-GalN	13,08 ± 3,35	471,40 ± 12,73	100,38 ± 12,80
Grup6:E./D-GalN	16,45 ± 5,76	472,72 ± 12,98	126,42 ± 19,30
P (ANOVA)	ns	<0,001	ns
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)		4-1: <0,001 4-2: <0,001 4-3: <0,001 4-5: <0,01 4-6: <0,01 5-1: <0,05 5-2: <0,05 5-3: <0,001 6-1: <0,05 6-2: <0,05	

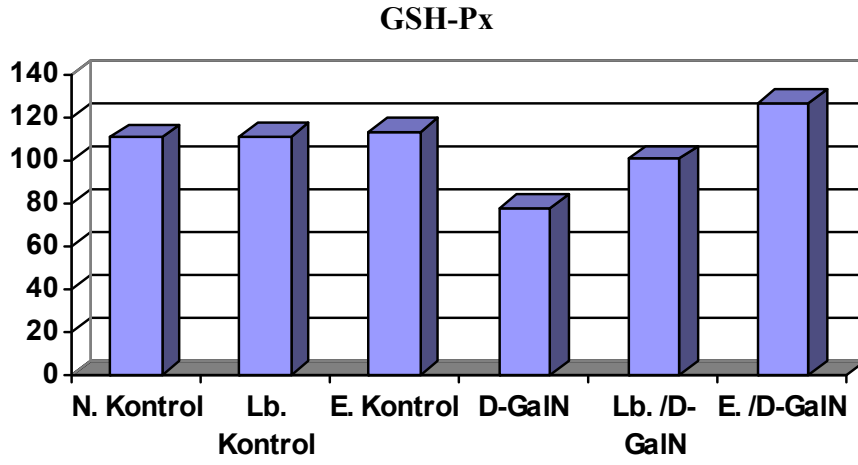
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 7. Karaciğer dokusunda CAT düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 8. Karaciğer dokusunda SOD düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 9. Karaciğer dokusunda GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.2.6. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri

D-GalN grubundaki karaciğer doku MDA düzeyi, Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol, Lb./D-GalN, E./D-GalN gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,001$).

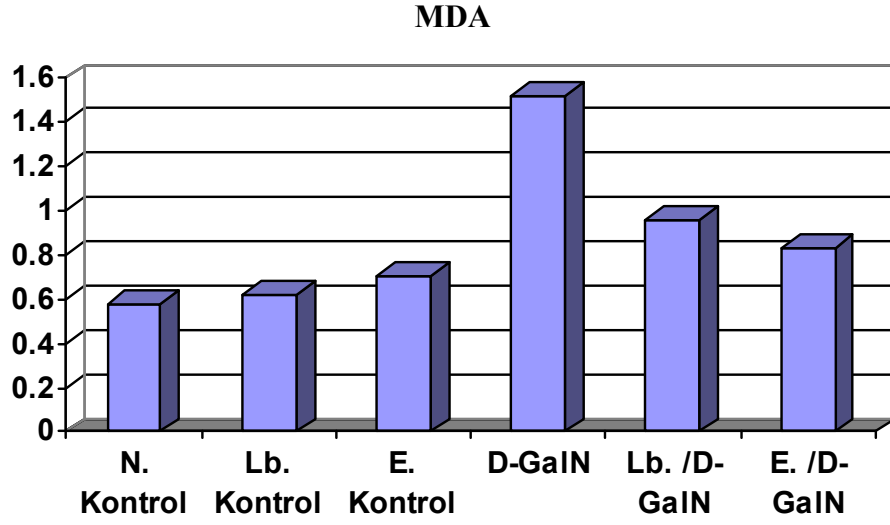
Lb./D-GalN grubundaki karaciğer doku MDA düzeyi Normal Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$).

Tablo 18 ve Şekil 10’da MDA düzeyleri gösterilmiştir.

Tablo 18. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA (mmol/gr protein)
Grup1:N. Kontrol	0,58 ± 0,04
Grup2:Lb. Kontrol	0,62 ± 0,03
Grup3:E. Kontrol	0,70 ± 0,07
Grup4:D-GalN	1,55 ± 0,19
Grup5:Lb./D-GalN	0,96 ± 0,08
Grup6:E./D-GalN	0,83 ± 0,14
P (ANOVA)	<0,001
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)	4-1: <0,001 4-2: <0,001 4-3: <0,001 4-5:<0,01 4-6: <0,001 5-1: <0,05

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 10. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri gruplara göre dağılımı

4.2.7. Karaciğer Dokusunda TNF- α Düzeyleri

D-GalN gurubundaki TNF- α konsantrasyonu, Normal Kontrol ve probiyotik öntedavisi yapılan kontrol gruplarındakinden farklı saptanmadı.

Bununla birlikte E./D-GalN grubundaki karaciğer doku TNF- α düzeyleri, Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol, D-GalN, Lb./D-GalN gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,001$).

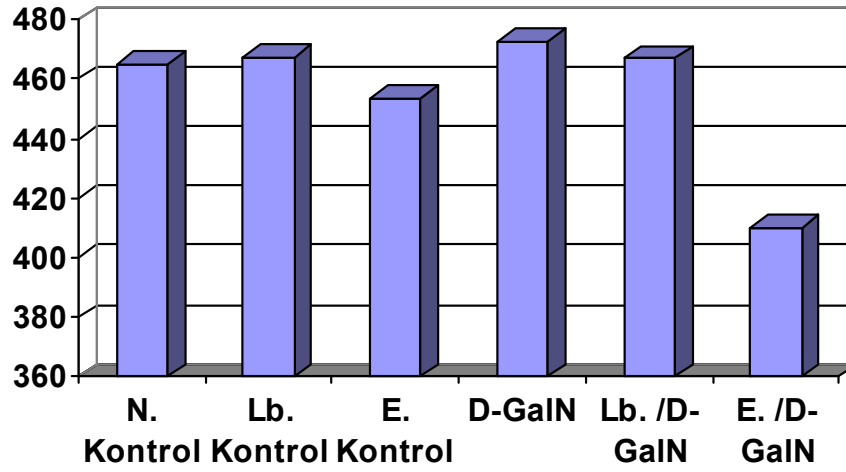
Tablo 19 ve Şekil 11’de TNF- α düzeyleri gösterilmiştir.

Tablo 19. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

Gruplar	TNF- α (pg/mg protein)
Grup1:N. Kontrol	465,12 \pm 6,51
Grup2:Lb. Kontrol	467,39 \pm 7,12
Grup3:E. Kontrol	453,58 \pm 5,99
Grup4:D-GalN	472,74 \pm 5,82
Grup5:Lb./D-GalN	466,86 \pm 8,19
Grup6:E./D-GalN	410,18 \pm 12,77
P (ANOVA)	<0,001
P (Post hoc Tukey test)	6-1: <0,001 6-2: <0,001 6-3: <0,01 6-4: <0,001 6-5: <0,001

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

TNF- α



Şekil 11. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı

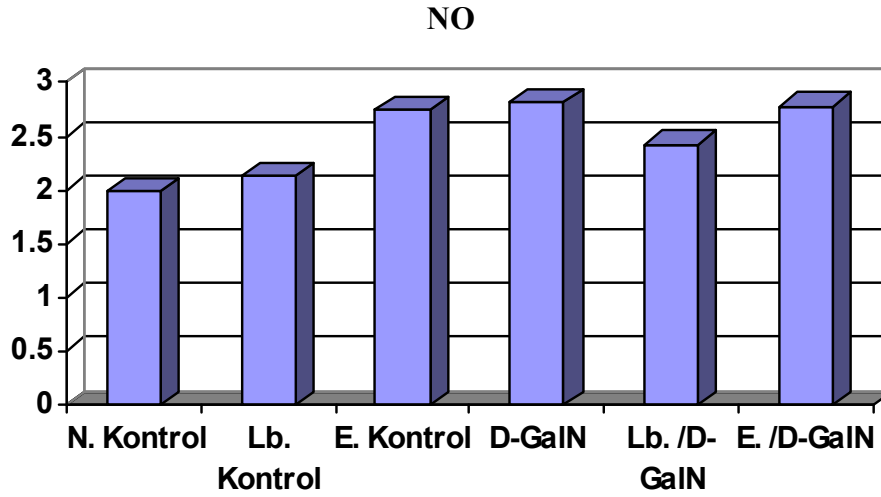
4.2.8. Karaciğer Dokusunda NO Düzeyleri

NO düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Tablo 20’de ve Şekil 12’de deney gruplarındaki NO düzeyleri sunulmuştur.

Tablo 20. Karaciğer dokusunda NO düzeyleri

Gruplar	NO (nmol/mg protein)
Grup1:N. Kontrol	1,99 ± 0,24
Grup2:Lb. Kontrol	2,13 ± 0,28
Grup3:E. Kontrol	2,74 ± 0,15
Grup4:D-GalN	2,81 ± 0,25
Grup5:Lb./D-GalN	2,43 ± 0,13
Grup6:E./D-GalN	2,79 ± 0,19
P (ANOVA)	ns

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 12. Karaciğer dokusunda NO düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.2.9. Histolojik Değerlendirme

D-GalN alan gruplarda hepatosellüler hasar Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p < 0,001$).

Lb./D-GalN alan grupta hepatosellüler hasar Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p < 0,001$).

E./D-GalN alan grupta hepatosellüler hasar Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p < 0,01$).

Tablo 21’de gruplar arasındaki histopatolojik değerlendirme sunulmuştur.

Tablo 21. Sıçanların gruplara göre histolojik değerleri

Gruplar	Karaciğerde hepatosellüler hasar Median (min-max)
Grup1:N. Kontrol	0 (0-4)
Grup2:Lb. Kontrol	1,5 (0-3)
Grup3:E. Kontrol	1 (0-2)
Grup4:D-GalN	4,5 (4-6)
Grup5:Lb./D-GalN	5 (2-6)
Grup6:E./D-GalN	5 (4-6)
P (ANOVA)	<0,001
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)	4-1: <0,001 4-2: <0,001 4-3: <0,001 5-1: <0,001 5-2: <0,001 5-3: <0,001 6-1: <0,001 6-2: <0,001 6-3: <0,001

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

4.2.10. Bakteri Kültürleri

Her gruptan rastgele seçilen 3'er adet sıçanların karaciğer ve dalaktan yapılan aerobik ve anaerobik bakteri kültürlerinde herhangi bir üreme gözlenmedi.

TARTIŞMA

Akut karaciğer yetmezliği (AKY) tek tedavisi transplantasyon olan ciddi bir karaciğer hastalığıdır. AKY semptomlar ortaya çıktıktan sonra 4 hafta içerisinde hepatik ensefalopati ve hepatik sentez fonksiyonunda azalma ile karakterizedir (9). Galaktoz yolağı ile metabolize olan ve bir amino şeker olan D-GalN selektif bir hepatotoksindir. İ.p uygulanan D-GalN hepatositlerde intrasellüler UTP havuzunu azaltarak RNA ve protein sentezini engeller (3), serum transaminaz düzeylerinin artışına, hepatik nekroza ve komaya yol açar (28). D-GalN'nin neden olduğu oksidatif hasarlanma, genellikle lipid peroksidasyonunun uyarıcısı ve hücre membranının yıkımının kaynağı olan hidroksil radikali (OH[•]) oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (28). D-GalN'nin deney hayvanlarında neden olduğu karaciğer lezyonunun morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin, insan viral hepatitine bir çok açıdan benzediği bildirilmiştir (113). Sıçanlardaki D-GAL hepatitinde; SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidatif enzim düzeylerinin azalmış olduğu da bildirilmiştir (30).

Biz çalışmamızda D-GalN ile uyarılan akut karaciğer hasarında probiyotiklerin bu hepatotoksik etkiyi azaltmada bir faydasının olup olmadığını araştırmayı hedefledik. Probiyotiklerin bu deneysel modelde, antioksidan özellikleri ve apoptozu modüle etmesi nedeni ile olumlu sonuç alabileceğimizi düşündük.

Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda D-GalN sıçanlara farklı dozlarda ve farklı uygulama şekilleri ile verilmiştir (3, 19, 20, 43). Biz çalışmamızda sıçanlara D-GalN'i daha önceden doku toksisite çalışmalarında tanımlandığı gibi i.p yolla tek seferde 1 mg/kg dozdan verdik (43, 44).

Stachlewitz ve ark. (56) tarafından yapılan bir çalışmada D-GalN ile uyarılan karaciğer yetmezliğinde glisin ve gadolinium klorür (GdCl₃) ve anti-TNF- α 'nın panlobüler, lokal, hepatosellüler nekrozu, polimorf nükleer hücre infiltrasyonunu, serum transaminazlarda artmayı ve makrofajlarda büyümeyi önleyerek olumlu etki sağladıklarını savunmuşlardır. Bu çalışmada D-GalN ile uyarılan karaciğer hepatitinde uridin'in kupffer hücrelerinden TNF- α salınımını önleyerek apoptozis ile nekrozun önlediğini savunmuşlardır.

Komano ve ark. (114) tarafından yapılan bir çalışmada ise glutamin ve glisin'in süprese edici etkisi ile D-GalN'nin indüklediği hepatiti her zaman kupffer hücreleri

inhibe ederek baskılamadığını bu da Stachlewitz ve ark. tarafından önerilen teorinin her zaman geçerli olmadığını öne sürmüşlerdir.

Önceki çalışmalarda D-GalN'in i.p olarak verilmesinin ardından ALT'de belirgin artmanın 18. saatte başladığı ve 24. saatte doruğa eriştiği bildirilmiştir (43, 44). Bu nedenle, D-GalN'nin i.p olarak verilmesinden 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

Deney 1'de D-GalN alan gruplarda almayanlara göre AST, ALT aktiviteleri hepatosellüler hasar belirteci olarak belirgin yüksek olarak saptandı.

Bazı ALT değerleri <0,8 gibi çok düşük seviyelerde saptandı. Bu durum karaciğerde ciddi nekrozun geliştiğine işaret etmektedir.

Deney 1'de kullanılan 10 probiyotik suşundan *L. plantarum* BK9-40 ve *E. malodaratus* AK7-32 deney 2'de kullanılmıştır.

Ohta ve ark. tarafından D-GalN ile karaciğer yetmezliği yapılan sıçanlarda tek başına D-GalN verilen grupta AST ve ALT değerinin doruğa ulaştığı gösterilmiştir (115).

Deney 2'de D-GalN alan gruplarda almayanlara göre histolojik olarak anlamlı derecede nekroz saptanması ve D-GalN grubunda Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre AST, ALT, ALP aktivitelerinde anlamlı derecede yükseklik saptanması D-GalN grubunda hepatotoksite geliştiğini göstermektedir. Deney 1'de olduğu gibi Deney 2'de de seçtiğimiz probiyotik ve D-GalN'in birlikte verildiği gruplarda <0,8 düzeyinin altında olan değer gözlenmedi, bunun kullandığımız probiyotiklerin olumlu etkisine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Başlangıçta ve çalışma sonunda tartılan sıçanların Normal kontrol grubu dışında ortalama kilolarında azalma gözlenmesinin nekroz gelişimine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu % ağırlık değişimi, karaciğer ağırlığı ve karaciğer /vücut ağırlığı oranı ile benzerdi.

Daha önce bahsedildiği gibi oksidatif stres durumlarında nonenzimatik antioksidan GSH ve enzimatik antioksidanlar olan SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri azalırken lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri artmaktadır.

Ohta ve ark. tarafından D-GalN ile karaciğer yetmezliği yapılan sıçanlarda GSH, SOD ve GSH-Px düzeylerinde azalma saptamışlardır (115). Gao ve arkadaşları

D-GalN ile indüklenen karaciğer yetmezliği yapılan sıçanlarda SOD ve GSH-Px düzeylerinde azalma saptamışlardır (116).

Ates ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada 3 gün boyunca soğuk stresine ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde artış saptamışlardır. Bahsedilen çalışmada soğuk stresi ile oluşan antioksidan enzimlerindeki azalmayı artmış ROS'a sekonder aşırı tüketime bağlamışlardır.

Antioksidan özelliği daha önceden bilinen Ganoderma Lucidum'un farelerde D-GalN hepatitinden koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada 750 mg/kg D-GalN verilen grupta karaciğer GSH ve SOD düzeyleri anlamlı olarak azalırken MDA düzeyleri artmıştır. Antioksidan Ganoderma Lucidum ile tüm bu değişen parametrelerin kontrol grubu ile benzer düzeylere geldiği görülmüştür (117). Antiinflamatuvar etkileri bilinen ve CCl_4 hepatotoksisitesine karşı koruyuculuğu daha önce kanıtlanmış olan Pinitol'un D-GalN (650 mg/kg) hepatotoksisitesindeki koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada D-GalN enjeksiyonundan 12 saat sonra değerlendirildiğinde Pinitol'un D-GalN hepatotoksisitesine bağlı karaciğer dokusundaki GSH, CAT depleksiyonunu ve MDA artışını engellediği bildirilmiştir (118). D-GalN (800 mg/kg) ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde Lygodium flexuosumun hepatotoksisite oluşturulmadan önce ve sonra verilmesinin D-GalN ile azalan GSH düzeylerinde artış ve D-GalN ile artan MDA düzeylerinde azalma sağladığı gösterilmiştir (119).

Xing ve ark. tarafından yapılan çalışmada probiyotiklerin karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarına karşı SOD'u artırarak koruyucu etki gösterdikleri saptanmıştır (75).

Çalışmamızda SOD'un D-GalN grubunda Normal Kontrol, Lb. Kontrol ve E. Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük olması D-GalN hepatotoksisitesinde oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Lb./D-GalN ve E./D-GalN grubunda SOD'un D-GalN grubuna göre anlamlı olarak yüksek iken kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük olması probiyotiklerin D-GalN hepatotoksisitesinin oluşturduğu oksidatif hasarı kısmen engellediğini göstermektedir.

Çalışmamızda D-GalN alan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GSH, CAT ve GSH-Px düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olması D-GalN grubunda

oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Lb./D-GalN ve E./D-GalN gruplarında ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da D-GalN grubuna göre GSH, CAT ve GSH-Px düzeylerinin yüksek olması probiyotik tedavisinin D-GalN'in karaciğerde yol açtığı oksidatif hasara karşı kısmen koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

D-GalN'in indüklediği karaciğer hasarının mekanizması, lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranının hasara uğraması ve geçirgenliğinin artması nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir (120).

Sakaguchi ve ark. (5), Yoshikawa ve ark. (120) tarafından, D-GalN ile yapılan daha önceki çalışmalarda lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda karaciğer dokusunda bakılan MDA düzeylerinin D-GalN grubunda Normal Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrole göre anlamlı olarak yüksek çıkması D-GalN grubunda oksidatif stresin arttığını göstermektedir.

Lb./D-GalN grubunda MDA'nın D-GalN grubuna göre anlamlı olarak düşük Normal Kontrol grubuna göre ise anlamlı yüksek olması Lb. probiyotiklerin D-GalN hepatotoksitesinin oluşturduğu oksidatif hasarı kısmen engellediğini göstermektedir.

E./D-GalN grubunda MDA'nın D-GalN grubuna göre anlamlı olarak düşük Normal Kontrol grubuna göre ise farklı olmaması E. probiyotiğinin D-GalN hepatotoksitesinin oluşturduğu oksidatif hasarı tamamen engellediğini göstermektedir.

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı olan bir sitokindir. TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, inflamasyonu artırır, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyararak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (56).

Pinitol'ün D-GalN (650 mg/kg) hepatotoksitesinde koruyuculuğunun araştırıldığı sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada sadece D-GalN verilen grupta D-GalN verildikten 24 saat sonra serum TNF- α düzeyi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (117). Benzer şekilde yeşil çayın D-GalN hepatitinden koruyuculuğunun araştırıldığı ratlarda yapılan bir çalışmada 500 mg/kg sadece D-GalN verilen grupta karaciğer dokusunda *reverse transkriptase polimerase chain reaction*

(RT-PCR) yöntemi ile çalışılan TNF- α mRNA ekspresyonunun D-GalN verildikten 24 saat sonra arttığı gösterilmiştir (121).

Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler (48). TNF- α 'nın karaciğer yetmezliği modellerinde sitotoksisite ve hücre proliferasyonuna yol açan ana mediatör olduğu gösterilmiştir (45). D-GalN'e bağlı karaciğer hasarı artmış TNF- α düzeyleri ile korelidir (28). D-GalN'e bağlı karaciğer yetmezliğinde anti-TNF- α antikoları ile profilaksi yapılması apoptozis ve nekrozu azaltmıştır (57).

Muntane ve ark. tarafından D-GalN ile karaciğer yetmezliği yapılan sıçanlarda tek başına D-GalN alan grupta kontrol grubuna göre TNF- α seviyelerinde artış gözlenirken PGE-1 ön tedavisi alan grupta TNF- α seviyelerinde azalma olduğunu göstermişlerdir (27). Osman N. ve ark. (74) endotoksin ve D-galaktozamin verilerek karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda yüksek TNF- α seviyelerini probiyotiklerin düşürdüğü saptanmışlardır. Xing ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda probiyotiklerin yüksek serum TNF- α seviyelerini düşürdüğü saptanmıştır (75).

Karaciğer dokusundaki TNF- α konsantrasyonunu D-GalN grubunda, N. Kontrol ve probiyotik ötedavisi yapılan gruplardakine benzer bulduk. Pleotropik proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α , doku hasarına cevap olarak hızlı bir şekilde üretilir (123). Bir çalışmada, farelerde D-GalN+LPS injeksiyonundan sonra, karaciğer dokusunda TNF- α konsantrasyonunun 2. saatte doruk düzeye ulaştığı, daha sonraki saatlerde düştüğü saptanmıştır (124). Bizim çalışmamızda sakrifikasyon işlemi 24. saatte yapıldığı için D-GalN alan gruplarda, daha önceki saatlerde artmış olan TNF- α konsantrasyonunu saptayamamış olmamız mümkündür. Bununla birlikte, D-GalN injeksiyonunun gerçekte TNF- α salınımını anlamlı olarak uyardığına ilişkin bir veri de bulunmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] ve poly(I:C)+D-GalN injeksiyonu yapıldığında TNF- α düzeyleri her iki grupta benzer bulunmuştur (125). Yazarlar bu bulguya dayanarak sadece D-GalN enjeksiyonunun TNF- α konsantrasyonu üzerine bir etkisinin olmadığını öne sürmüşlerdir.

Öte yandan, E./D-GalN grubundaki TNF- α düzeyini, diğer tüm gruplardakinden düşük bulduk. Bu bulgu, E. malodoratus öntedavisinin karaciğer yıkımını önlemekte başarısız olmasına karşın, kısmi bir antiinflamatuvar aktivite gösterdiğine işaret etmektedir.

TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit salınımını artırmaktadır. Yapılan bir çalışmada hemin öntedavisi ile HO-1 upregülasyonun D-GalN/LPS koruyuculuğuna bakılmış, MDA, TNF- α , INOS/NO, Cas3 ve histolojik hasar azalması ile HO-1 upregülasyonunun hepatotoksisitede koruyucu etkisi olduğunu düşünmüşlerdir (122).

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasada NO düzeyi D-GalN alan grupta N. Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol gruplarına göre yüksek saptandı. Lb./D-GalN ve E./D-GalN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük olması Lb. ve E. probiyotiklerinin D-GalN hepatotoksisitesinde kısmen faydalı olabileceğini göstermektedir.

Muntane ve ark. (27) ve Stachlewitz ve ark. (56) sıçanlarda D-GalN verilmesinin ardından karaciğerde hepatosellüler hasar geliştiğini histokimyasal olarak göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da D-GalN grubunda hepatosellüler hasar N. Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla gözlenmesi D-GalN 'ın hepatosellüler hasara yol açtığını göstermektedir. Lb./D-GalN ve E./D-GalN grupları ile D-GalN grubu arasında histolojik hasar açısından fark olmaması Lb. ve E. probiyotiklerinin D-GalN'in yol açtığı histolojik hasarı düzeltmediğini göstermektedir.

Bakteriyel translokasyonun değerlendirilmesi için yapılan aerobik ve anaerobik bakteri kültürlerinde herhangi bir üreme gözlenmedi.

SONUÇ

Tek doz 1 gr/kg D-GalN'ın sıçanların karaciğer dokusunda histopatolojik olarak hepatosellüler hasara yol açtığı ve SOD'u azalttığı gösterildi. D-GalN enjeksiyonunun LPO'un son ürünü olan ve oksidatif stresin iyi bir belirtisi olan MDA düzeyini yükselttiği saptandı. Probiyotiklerin D-GalN hepatitindeki MDA düzeylerinin yükselmelerini, SOD düzeyindeki azalmayı engellediği ancak histolojik olarak D-GalN ile oluşturulan hepatit modelinde probiyotiklerin koruyucu etkisinin olmadığı gözlemlendi.

ÖZET

AMAÇ: Çalışmamızda D-galaktozamin (D-GalN) ile uyarılan akut karaciğer hasarında probiyotiklerin koruyucu etkinliğinin olup olmadığını araştırmayı hedefledik.

MATERYAL ve METOD: 2 aşamalı bir deney yaptık. İlk deneyin amacı D-GalN'in uyardığı AST ve ALT yükselmesini en fazla düşüren 2 probiyotik suşunu ikinci deney için seçmekti. Deneyde toplam 48 adet erkek Wistar-Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 4'er adet olmak üzere 12 gruba ayrıldı. 10 gruba farklı probiyotik suşları verildi, iki grup ise kontrol grubu olarak ayrıldı. Deney sonunda 2 adet probiyotik suşu 2. deney için seçildi (*L. plantarum* BK9-40 (Lb) ve *E. malodaratus* AK7-32 (E.)). Deney 2'de N. Kontrol, Lb. Kontrol, E. Kontrol, D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN olmak üzere toplam 48 sıçandan 6 grup oluşturuldu. Lb. Kontrol, E. Kontrol, Lb./D-GalN, E./D-GalN gruplarına 7 gün süresince probiyotik verildi. 7. gün D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN gruplarına i.p 1gr/kg dozunda D-GalN kontrol gruplarına SF i.p verildi. 8. gün sakrifiye edilerek vena cava inferiordan kan, karaciğer ve dalaktan doku örnekleri alındı. Serumda karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT, ALP) karaciğer dokusundan hazırlanan homojenatlarda GSH, CAT, SOD, GSH-Px, MDA, TNF- α , NO düzeyleri çalışıldı. Karaciğer dokusunun histolojik incelemesi ve karaciğer ile dalaktan alınan örneklerle aerob ve anaerob bakteri kültürleri yapıldı.

BULGULAR: 1 gr/kg dozunda i.p olarak verilen D-GalN ile sıçanlarda histolojik ve biyokimyasal olarak akut karaciğer hasarı gözlemlendi. D-GalN grubunda akut karaciğer hasarının biyokimyasal parametreleri ve karaciğer dokusunda MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksek iken SOD düzeyi anlamlı olarak düşük saptandı. Lb/D-GalN ve E./D-GalN gruplarında MDA D-GalN grubuna göre anlamlı derecede daha düşük iken SOD düzeyi anlamlı derecede yüksek saptandı. Lb./D-GalN grubunda MDA düzeyi N. Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken E./D-GalN grubunda N.Kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık yoktu. E./D-GalN grubundaki TNF- α düzeyini, diğer tüm gruplardakinden düşük bulduk. Bu bulgu, *E. maloduratus* öntedavisinin karaciğer yıkımını önlemekte başarısız olmasına karşın, kısmi bir antiinflamatuvar aktivite gösterdiğine işaret etmektedir.

GSH, CAT, GSH-Px düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Histopatolojik olarak D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN gruplarında hepatosellüler hasarın oluştuğunu gözledik.

Anahtar Sözcükler: D-Galaktozamin (D-GalN), Akut karaciğer yetmezliği, Probiyotik, Oksidatif stres

SUMMARY

“The protective effect of probiotics on the D-galactosamine induced hepatitis in rats”

AIM: In our study we aimed to investigate the possible protective effect of probiotics on the D-galactosamine (D-GalN) induced hepatotoxicity.

MATERIALS AND METHODS: We did our study in two parts. The first part aimed to choose two probiotic species which protects mostly from D- GalN hepatotoxicity, and leads lower AST- ALT levels. In first experiment forty eight male Wistar rats were randomly divided into twelve groups. All 12 groups contained 4 rats in each group. Two groups were control groups. Different probiotic species were given to other ten groups. At the end of the first experiment two probiotic species were chosen for second experiment (*L. plantarum* BK9-40 (Lb.) ve *E. malodaratus* AK7-32 (E.)). In second experiment, 48 rats were divided into six groups; N. Control, Lb. Control, E. Control, D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN. Lb. Control, E. Control, Lb./D-GalN, E./D-GalN groups were given probiotics for 7 days. Seventh day, D-GalN, Lb./D-GalN, E./D-GalN groups were given i.p 1gr/kg D-GalN; control groups were given SF i.p. Twenty-four hours later all animals were sacrificed, laparotomy was performed and liver tissues were taken. Liver tissue samples were histologically evaluated. Malonyldialdehyde (MDA), glutation (GSH), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and Nitric Oxide (NO) levels from liver were evaluated. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities were also analzed in liver tissue. AST, ALT and ALP activities were analyzed in serum which obtained from vena cava inferior.

RESULTS: Dose of 1gr/kg i.p. D-GalN caused to acute hepatic damage histologically and biochemically in all rats. While biochemical parameters of acute hepatic damage and MDA levels of liver tissue were significantly increased, SOD levels were significantly decreased in D-GalN group. While MDA levels were detected significantly lower, SOD levels were significantly higher in Lb/D-GalN and E./D-GalN groups than D-GalN group. While MDA levels were significantly higher in Lb./D-GalN than N.Control group; MDA levels were not significantly different between E./D-GalN

group and N.Control group. TNF- α levels in group E./ D-GalN were lower than other groups. This finding shows that premedication with *E. maloduratus* is not protective against liver damage, but has a particular antiinflammatory activity.

GSH, CAT and GSH-Px enzyme levels were not significantly different between all groups.

Hepatocellular damage was found in D-GalN, Lb./D-GalN and E./D-GalN groups histologically. But no protective effect of probiotics was shown histologically.

Key words: D-galactosamine (D-GalN), Hepatotoxicity, Probiotics, Oxidative stress

EK 1

Tablo 22. Deneyde kullanılan malzemeler

1	SOD (Spektrofotometrik 100 test)
2	GSH-Px (Spektrofotometrik 100 test)
3	AST(Abbott-Aeroset uyumlu)
4	ALT(Abbott-Aeroset uyumlu)
5	ALP(Abbott-Aeroset uyumlu)
6	T.Bilirubin(Abbott-Aeroset uyumlu)
7	BCIP/NBT Phosphatase Substrate(Sigma 100 ml)
8	HPLC MDA kiti (100 test)
9	Sodium chloride NaCl (1 kg)
10	Perchloric acid (2.5 L)
11	KH ₂ PO ₄ (1 Kg)
12	Tris HCl (500g)
13	D-galaktozamin (5 gr)
14	Vacurette EDTA lı hemogram tüpü (2 ml 50 lik)
15	Vacurette Jelli biyokimya tüpü (8 ml 50 lik)
16	Ependorf tüpü kapaklı 2 ml (1000 lik)
17	Mavi pipet ucu 1000 �l (1000 lik)
18	Sarı pipet ucu 200 �l (1000 lik)
19	Cam tüp 13x100 mm
20	Doku takip kaseti (kapaklı plastik 250 lik)
21	Lam Rodajlı (�ift taraflı 50 lik)
22	Lamel 44x50 mm
23	Boncuk parafin (60 c 5 kg)
24	Entellan 100 ml
25	Ksilen 2.5 lt
26	Mikrotom Bıçağı S 35 (feather) 50'lik kutuda
27	Hematoksilen solüsyonu
28	Eozin solüsyonu

29	Xylazine (500 mg)
30	Skim milk
31	Rat yemi
32	Formol %10 (2.5 L)
33	İdrar kabı (non steril)
34	Wistar Albino sıçan (200-250 gr)
35	Flaster (10 cm)
36	Polikarbonat Tip 4 Kafes Seti
37	Ketamin
38	M 17 agar (500 gr)
39	MRS broth (500 gr)
40	EMB agar (500 gr)
41	Steril kanlı agar plakları
42	BPLS agar (500 gr)
43	PDA (500 gr)
44	Bakır sülfat susuz (250 gr)
45	N- (1-Naphthyl) Ethylene diamin dihydrochloride 10 gr

KAYNAKLAR

1. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991;36:770-774.
2. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl*. 2000 Jan;6(1):21-31.
3. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol*. 1968 Oct;9(2):279-90.
4. Gu CH, Cao R, Wang GX. [Protective effect of prostaglandin E on hepatocytes and its value of early treatment of severe viral hepatitis] *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 1991 Jan;30(1):17-20, 60. Chinese.
5. Sakaguchi S, Yokota K. Role of Ca²⁺ on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge: lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice. *Pharmacol Toxicol*. 1995 Aug;77(2):81-6.
6. Kasravi FB, Wang L, Wang XD, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology*. 1996 Jan;23(1):97-103.
7. Adawi D, Ahrné S, Molin G. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *Int J Food Microbiol*. 2001 Nov 8;70(3):213-20.
8. Trey C, Lipworth L, Chalmers TC, Davidson CS, Gottlieb LS, Popper H, Saunders SJ. Fulminant hepatic failure. Presumable contribution to halothane. *N Engl J Med*. 1968 Oct 10;279(15):798-801.
9. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*. 1993 Jul 31;342(8866):273-5. Erratum in: *Lancet* 1993 Oct.16;342(8877):1000.
10. Murphy N. An update in acute liver failure: when to transplant and the role of liver support devices. *Clin Med*. 2006 Jan-Feb;6(1):40-6.
11. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*. 2002 Dec 17;137(12):947-54. Summary for patients in: *Ann Intern Med*. 2002 Dec 17;137(12):I24.
12. David A. Sass and A. Obaid Shakil. Fulminant Hepatic Failure. *Liver Transplantation*, Vol 11, No6(June),2005:pp 594-605.
13. Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, Fung JJ, Rakela J. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. *Liver Transpl*. 2000 Mar;6(2):163-9.
14. Ede RJ, Williams RW. Hepatic encephalopathy and cerebral edema. *Semin Liver Dis*. 1986 May;6(2):107-18.

15. Gazzard BG, Portmann B, Murray-Lyon IM, Williams R. Causes of death in fulminant hepatic failure and relationship to quantitative histological assessment of parenchymal damage. *Q J Med.* 1975 Oct;44(176):615-26.
16. O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J.* 2005 Mar;81(953):148-54.
17. Kelly DA. Managing liver failure. *Postgrad Med J.* 2002 Nov;78(925):660-7.
18. Mourelle M, Villalon C, Amezcua JL. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 1988;6:337-342.
19. Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, et al. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978;74:664-671.
20. Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS, et al. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1995;21:796-804.
21. Diaz-Buxo JA, Blumenthal S, Hayes D, Gores P, Gordon B. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 1997;25:950-957.
22. Kalpana K, Ong HS, Soo KC, Tan SY, Raj JP. An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res* 1999;82:121-130.
23. Kelly JH, Koussayer T, He DE, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology.* 1992 Feb;15(2):329-35.
24. Peeling J, Shoemaker L, Gauthier T, Benarroch A, Sutherland GR, Minuk GY. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol.* 1993 Sep;265(3 Pt 1):G572-8.
25. Sutherland DE, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery* 1977;82:124-132.
26. Smith JS, Harrison GG. The effects of multiple anaesthetics on the livers of rats subjected to microsomal enzyme induction. A preliminary report. *S Afr Med J* 1973;47:797-799.
27. Muntané J, Montero JL, Marchal T, Perez-Seoane C, Lozano JM, Fraga E, et al. Effect of PGE1 on TNF-alpha status and hepatic D-galactosamine-induced apoptosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998 Feb;13(2):197-207.
28. Barry H, Gutteridge JMC, 1989. In: Barry H (Ed) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Pres, Oxford, pp.254-255.
29. Tokumaru S, Takeshita S, Nakata R, Tsukamoto I, Kojo S. Change in the level of vitamin C and lipid peroxidation in tissues of the inherently scorbutic rat during ascorbate deficiency. *J Agric Food Chem* 1996;44:2748-53.
30. Neihörster M, Inoue M, Wendel A. A link between extracellular reactive oxygen and endotoxin-induced release of tumour necrosis factor alpha in vivo. *Biochem Pharmacol.* 1992 Mar 3;43(5):1151-4.

31. Tsutsui S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki S, Kawamura S, Maeda K, Mikami T, Doi K. Apoptosis of murine hepatocytes induced by high doses of galactosamine. *J Vet Med Sci.* 1997 Sep;59(9):785-90.
32. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1994 Dec 9;269(49):30761-4.
33. Hayami S, Ikeda K, Sun F, Tanaka K, Kojo S. Increase of caspase-3 activity in rat liver and plasma by thioacetamide. *Biochem Pharmacol.* 1999 Dec 15;58(12):1941-3.
34. Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Feb 14;1535(2):186-91.
35. Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001 Jun;47(4):661-73.
36. Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3480-6.
37. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* 1985 Aug 30;229(4716):869-71.
38. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, DeGeorge GL, Laskin JD, Laskin DL. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology.* 1998 Mar;27(3):748-54.
39. Muntané J, Rodríguez FJ, Segado O, Quintero A, Lozano JM, Siendones E et al. TNF-alpha dependent production of inducible nitric oxide is involved in PGE(1) protection against acute liver injury. *Gut.* 2000 Oct;47(4):553-62.
40. Bird GL, Sheron N, Goka AKJ. Tumor necrosis and alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1991;53:1079-56.
41. Martinez OM, Krams SM, Sterneck M, Villanueva JC, Falco DA, Ferrell LD, Lake J, Roberts JP, Ascher NL. Intra-graft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation.* 1992 Feb;53(2):449-56.
42. Ryan CJ, Anilkumar T, Ben-Hamida AJ, Khorsandi SE, Aslam M, Pusey CD, et al. Multisorbent plasma perfusion in fulminant hepatic failure: effects of duration and frequency of treatment in rats with grade III hepatic coma. *Artif Organs.* 2001 Feb;25(2):109-18.
43. Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jan 1;65(1):101-7.

44. Yamaguchi M, Miyashita Y, Kumagai Y, Kojo S. Change in liver and plasma ceramides during D-galactosamine-induced acute hepatic injury by LC-MS/MS. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004 Aug 2;14(15):4061-4.
45. Öztürk F. Apoptoz. *Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002, 9, 2, 143-148
46. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000, 256, 42-49.
47. Fadeel B, Orrelius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479-517.
48. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate and nitric oxide/ superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7162-7166.
49. Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 1999; 6:495-496.
50. Ray SD, Sorge CL, Kamendulis LM, Corcoran GB. Ca(++)-activated DNA fragmentation and dimethylnitrosamine-induced hepatic necrosis: effects of Ca(++)-endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Oct;263(1):387-94.
51. Tsukidate K, Yamamoto K, Snyder JW, Farber JL. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol*. 1993 Sep;143(3):918-25.
52. Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: correlation of nuclear Ca²⁺ accumulation and early DNA fragmentation with cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991 Nov;111(2):242-54.
53. Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, Giacomini L, Faa G, Oliverio S, Piacentini M, Columbano A. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol*. 1991 Nov;139(5):1099-109.
54. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol*. 1994 Aug 15;153(4):1778-88.
55. Ferraz JG, Tigley AW, Appleyard CB, Wallace JL. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1997; 272:809-814.
56. Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):737-45.
57. Libert C, Van Bladel S, Brouckaert P, Shaw A, Fiers W. Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1991 Apr 15;146(8):2625-32.

58. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39: 237-238.
59. Fuller R, Perdigon G. Probiotics 3- Immunomodulation by the gut microflora and probiotics. *Kluwer Academic Publishers* 2000.
60. Gismondo MR, Drago L. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobiol Agents*, 1999, 12;287-292.
61. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mattö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000,84;197-215.
62. Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Antimicrobial Agents*. 2000, 16;531-536.
63. Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Dec;5(6):596-603.
64. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Seppo Salminen. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 1999, 9;43-52.
65. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic lactobacillus strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 68;135-140.
66. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* 2001,152;167-173.
67. Strus M, Pakosz K, Gościński H, Przondo-Mordarska A, Rozynek E, Pituch H, Meisel-Mikołajczyk F, Heczko PB. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia* 2001, 53;133-142.
68. Shah U, Walker WA. Adverse host responses to bacterial toxins in human infants. *J Nutr* 2000; 130(suppl): 420-425.
69. Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003, 17(5); 741-754.
70. Rastall RA, Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B, Reid G, Rowland IR, Sanders ME. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology* 2005, 52;145-152.
71. Matsuu M, Shichijo K, Okaichi K, Wen CY, Fukuda E, Nakashima M, Nakayama T, Shirahata S, Tokumaru S, Sekine I. The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003,44;111-115.

72. Nagira T, Narisawa J, Teruya K. Suppression of apoptosis in UV-damaged human melanoma cells kefir was mediated through the inhibition of caspase-3 activation. by a fermented milk, Kefir. In: *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, Eds. A. Bernard et al. 1999, *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands. 437–439.
73. Henriksson R, Franzén L, Sandström K, Nordin A, Arevärn M, Grahn E. Effects of active addition of bacterial cultures in fermented milk to patients with chronic bowel discomfort following irradiation. *Support Care Cancer* 1995; 3:81–83.
74. Osman N, Adawi D, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry. *Dig Liver Dis*. 2007 Sep;39(9): 849-856.
75. Xing HC, Li LJ, Xu KJ, Shen T, Chen YB, Sheng JF, Chen Y, Fu SZ, Chen CL, Wang JG, Yan D, Dai FW, Zheng SS. Protective role of supplement with foreign *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;21(4): 647-656.
76. Cenesiz S, Devrim AK, Kamber U, Sozmen M. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2008 Jan;115(1):15-19.
77. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658–672.
78. Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 67–73.
79. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 365S–373S.
80. Muscettola M, Massai L, Tanganelli C, Grasso G. Effects of lactobacilli on interferon production in young and aged mice. *Ann NY Acad Sci* 1994; 717: 226–232.
81. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998;42: 39-44.
82. Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72: 3299– 3309.
83. Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1474–1479.
84. Senok AC, Ismaeel AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Dec;11(12):958-66.
85. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 1982, 4;412-426.

86. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993, 49; 479-481.
87. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
88. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya, 1995. 1-132.
89. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984, 222;1-15.
90. Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-89.
91. Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo GJ. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *Clin Anesth* 2004, 16(3):189-194.
92. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003, 189; 41-54.
93. Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosil-L-methionine in Fe (+2) initiated antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2004, 36:1303-1316.
94. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005, 26;257-264.
95. Nakano A, Koyama I, Matsunaga T, Nakajima T, Hirose H, Sato M, Komoda T. Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose. *Rinsho Byori* 1999; 7: 676-681.
96. Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 5: 385-392.
97. Cetiner M, Sener G, Sehirli AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvancı S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yegen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209: 39-50.
98. Mollaoğlu H. GSM 900 MHz telefonların oluşturduğu manyetik alanın etkisiyle meydana gelen oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. *Uzmanlık tezi. Süleyman Demirel Üniv Tıp Fak Fizyoloji AD* 2003.
99. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005, 164;775-778.
100. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
101. Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 2006.

102. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 1986; 77: 319-321.
103. McCord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocytes. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
104. Başığit, G., 2004. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri. *Yüksek Lisans Tezi (basılmamış), Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.*
105. Başığit Kılıç, G., 2008. Bazı laktobasil suşlarının genetik tanısının yapılması ve faj dirençliliklerinin belirlenmesi. *SDÜ-BAP*, Proje no 1268-D06.
106. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 Nov 15;827(1):76-82.
107. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
108. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: *Academic Press*, 1974; 673-677.
109. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
110. Beutler E, Duran O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963, 61:882-888.
111. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
112. K. Ishak, A. Baptista, L. Bianchi. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 1995; 22; 696-9.
113. Jonker AM, Dijkhuis FWJ, Kroese FGM, Hardonk MJ, Grond J. Immunopathology of acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* 1990;11:622-627.
114. Komano T, Yokoyama Funakoshi R, Egashira Y, Sanada H. Mechanism of the suppression against D: -galactosamine-induced hepatic injury by dietary amino acids in rats. *Amino Acids*. 2008 Jul 20.
115. Ohta Y, Matsura T, Kitagawa A, Tokunaga K, Yamada K. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species contribute to the development of D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Free Radic Res*. 2007 Feb;41(2):135-44.
116. Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 28;11(24):3671-4.

117. Zhou Y, Park CM, Cho CW, Song YS. Protective effect of pinitol against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Jul;72(7):1657-66.
118. Wills PJ, Asha VV. Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) against D-galactosamine induced liver injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006 Nov 3;108(1):116-23.
119. Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol Cell Biochem.* 2008 May;312(1-2):39-46.
120. Yoshikawa T, Yokoe N, Takemura S, Kato H, Hotta T, Matsumura N, Ikezaki M, Hosokawa K, Kondo M. Lipid peroxidation and lysosomal enzymes in D-galactosamine hepatitis and its protection by vitamin E. *Gastroenterol Jap* 1979; 14: 31-9.
121. Abe K, Ijiri M, Suzuki T, Taguchi K, Koyama Y, Isemura M. Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed Res.* 2005 Oct;26(5):187-92.
122. Wen T, Wu ZM, Liu Y, Tan YF, Ren F, Wu H. Upregulation of heme oxygenase-1 with hemin prevents D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute hepatic injury in rats. *Toxicology.* 2007 Jul 31;237(1-3):184-93.
123. Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 216: 167-187.
124. Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, et al. Etoposide prevents apoptosis in Mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology.* 2001; 33: 1441-1450.
125. Dejager L, Libert C. Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly (I:C) in D-galactosamine-sensitized mice. *Cytokine.* 2008; 42: 55-61.