

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN İLE  
OLUŞTURULAN HEPATİTTE KEFİR'İN KORUYUCU  
ETKİSİ**

**Dr. Yunus UGAN**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet İŞLER**

**ISPARTA**

**2008**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN İLE  
OLUŞTURULAN HEPATİTTE KEFİR'İN KORUYUCU  
ETKİSİ**

**Dr. Yunus UGAN**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet İŞLER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
tarafından 1361-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA**

**2008**

## 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. Ülkü SARITAŞ, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç.Dr. H. Şenol COŞKUN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Uzm. Dr. Murat DEMİR, Uzm. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, laboratuvar çalışmamda emeği geçen Dr. Abdulkadir BAŞTÜRK, Dr. Erkan CÜRE, Dr. Kasım DEMİR, Dr. Ali Rıza BAYKAL 'a, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, 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 ve kardeşlerime, çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim Aysun'a en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Yunus UGAN

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akut Karaciğer Yetmezliği	3
2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği Sınıflama	3
2.1.2. Akut Karaciğer Yetmezliği Etiyoloji	3
2.1.3. Akut Karaciğer Yetmezliği Patogenez	4
2.2. D-Galaktozamin Hepatiti	5
2.3. Probiyotikler	6
2.3.1. Kefir	8
2.3.2. Kefirin İçeriği ve Kefir Granülleri	8
2.3.3. Kefirle Yapılan Çalışmalar	10
2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	12
2.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	13
2.6. Serbest Oksijen Radikal Türleri	14
2.7. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	14
2.7.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	14
2.7.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	15

2.8. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	16
2.8.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	16
2.8.2. Enzimatik Antioksidanlar	17
2.8.2.1. Glutasyon Peroksidaz	17
2.8.2.2. Katalaz	18
2.8.2.3. Süperoksit Dismutaz	18
3. MATERYAL ve METOD	20
3.1. MATERYAL	20
3.1.1. Deney Hayvanları	20
3.1.2. Kefirin Hazırlanması	20
3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler	21
3.2. METOD	21
3.2.1. Sıçanların Beslenme Modeli	21
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	21
3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	23
3.2.4. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması	23
3.2.4.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	23
3.2.4.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması	23
3.2.5. Dokularda Biyokimyasal Analizler	24
3.2.6. Histopatolojik Analiz Yöntemleri	24
3.2.7. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Sıçanların Gruplara Göre Tükettikleri Toplam Çeşme Suyu, Kefir ve Yem Miktarları	26

4.2. Sıçanlardaki Ağırlık Değişiklikleri	26
4.3. Sıçanlardaki Karaciğer Ağırlık Değişiklikleri	27
4.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri	27
4.5. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Düzeyleri	30
4.6. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Düzeyleri	31
4.7. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri	32
4.8. Karaciğer Dokusunda MPO Düzeyleri	33
4.9. Karaciğer Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri	34
4.10. Karaciğer Dokusunda IL-10 Düzeyleri	35
4.11. Histolojik Değerlendirme	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	41
7. ÖZET	42
8. SUMMARY	43
9. KAYNAKLAR	44

## KISALTMALAR

GAL	D-Galaktozamin
ALP	Alkalen fosfataz
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
SOR	Serbest oksijen radikali
AKY	Akut karaciğer yetmezliği
TNF- $\alpha$	Tümör nekrozis faktör alfa
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat
OH $^-$	Hidroksil iyonu
O $_2^-$	Süperoksit anyonu
H $_2$ O $_2$	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
HOCl	Hipokloröz asit
LOOH	Lipid hidroperoksit
LOO $^{\cdot}$	Peroksil radikalleri
ATP	Adenozin trifosfat
i.p.	İntraperitoneal
SF	Serum fizyolojik

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1:</b>	Kefir tanesi
<b>Şekil 2:</b>	Glutasyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü
<b>Şekil 3:</b>	Serum ALT seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 4:</b>	Serum AST seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 5:</b>	Serum ALP seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 6:</b>	Serum PT değerlerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 7:</b>	Serum INR değerlerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 8:</b>	KC dokusunda glutatyon seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 9:</b>	KC dokusunda katalaz seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 10:</b>	KC dokusunda SOD seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 11:</b>	KC dokusunda GSH-Px seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 12:</b>	KC dokusunda MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 13:</b>	KC dokusunda MPO düzeylerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 14:</b>	KC dokusunda TNF- $\alpha$ seviyelerinin gruplara göre dağılımı
<b>Şekil 15:</b>	KC dokusunda IL-10 seviyelerinin gruplara göre dağılımı



## TABLÖLAR

<b>Tablo 1:</b>	Akut karaciğer yetmezliğinin bilinen nedenleri
<b>Tablo 2:</b>	Probiyotik olarak sıklıkla kullanılan bakteriler
<b>Tablo 3:</b>	Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar
<b>Tablo 4:</b>	Kullanılan malzeme ve aletler
<b>Tablo 5:</b>	Deney protokolü, günlere göre ilaç uygulamaları
<b>Tablo 6:</b>	Sıçanların tükettikleri çeşme suyu, kefir ve sıçan yemi miktarları
<b>Tablo 7:</b>	Çalışma başlangıcı ve sakrifikasyon öncesi sıçanların ortalama ağırlıkları
<b>Tablo 8:</b>	Sıçanlardaki karaciğer ağırlık değişiklikleri
<b>Tablo 9:</b>	Çalışma gruplarında karaciğer fonksiyon testleri
<b>Tablo 10:</b>	Çalışma gruplarında karaciğer fonksiyon testleri
<b>Tablo 11:</b>	Karaciğer dokusunda Glutasyon düzeyleri
<b>Tablo 12:</b>	Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri
<b>Tablo 13:</b>	Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri
<b>Tablo 14:</b>	Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi
<b>Tablo 15:</b>	Karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$ düzeyleri
<b>Tablo 16:</b>	Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri
<b>Tablo 17:</b>	Sıçanların gruplara göre hepatosellüler hasar derecesi

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kimyasal ajanlarla oluşturulan karaciğer hücre hasarı, hepatosit kaybına kadar giden bir takım ardışık kompleks olayların meydana gelmesine yol açabilir. Karaciğer hastalıklarıyla ilgili bir çok hastalığa ışık tutmak amacıyla karaciğer hastalıklarının patogenezi taklit edebilen bir çok kimyasal ajan kullanılmıştır. Deneysel hepatit modelleri arasında D-Galaktozamin (GAL) ile yapılan karaciğer hasarı, morfolojik ve fonksiyonel özellikleri itibariyle insanlarda görülen viral hepatitlerdeki karaciğer hasarına çok benzerdir (1).

Birçok çalışmaya göre, GAL'in sitotoksik etkisinde, endojen lipidlerin peroksidasyonu major faktör gibi görünmektedir (2,3). GAL enjeksiyonu ile karaciğer lezyonu uyarılmasından önce, uygulanan *Lactobacillus plantarum* ön tedavisinin, bakteriyel translokasyonu ve karaciğer hücre hasarını azalttığı saptanmıştır (4,5). Ayrıca, GAL'in uyardığı karaciğer lezyonlarının patogenezinde endotoksin'in rolünü saptayan çalışmalar da vardır (6,7).

Kefir, çok eski yıllardan beri özellikle Kafkasya bölgesinde yapılan, bugün ise Avrupa ve Amerika ülkelerinde ticari maksatla imal edilen köpüklü, koyu kıvamlı, hafif ekşimsi bir içecektir. Kefirin antioksidan özelliği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Farelerde oluşturulan karbon tetraklorür toksisitesinde kefirin antioksidan parametreleri olumlu yönde etkilediği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (8). Kefirin içeriğinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar vardır. Probiyotikler, innate ve adaptif immün yanıtı modüle ederler. *Lactobacillus rhamnosus GG*'nin, lipopolisakkarid-stimulated makrofaj TNF-alfa yapımını inhibe ettiği saptanmıştır (9).

Kefirle ilgili bugüne kadar birçok çalışma yapılmasına rağmen GAL hepatitinin önlenmesinde kefir kullanılmamıştır. GAL hepatitinin önlenmesinde probiyotik ürün olarak kefiri seçmemizin nedeni, ülkemizde üretilmesi, yaygınlaştırılabilir ve hoş tadı olan bir içecek olmasıdır. Kefirin toksik hepatitte koruyucu bir etkinliği olabilir. Bu çalışmada sıçanlarda GAL ile oluşturulan hepatitin kefir ön tedavisiyle önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla karaciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme, enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px); non-enzimatik antioksidan olan glutatyon; doku hasarında kesin bir tetikleyici mekanizma olarak kabul edilen ve dokuya lökosit

invazyonunun bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA); proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  ve antiinflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-10 tayini yapıldı. Kefirin belirtilen parametreler üzerine etkisi incelendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akut Karaciğer Yetmezliği

Akut karaciğer yetmezliği (AKY), önceden herhangi bir karaciğer hastalığı bulunmaksızın karaciğer fonksiyonlarının aniden ve ciddi bir şekilde bozulmasıyla karakterize, sıklıkla ensefalopatinin eşlik ettiği, potansiyel olarak geri dönüşümlü olabilen ancak mortalitesi oldukça yüksek bir klinik sendromdur. Birçok vakada, AKY ilaca bağlı ya da viral hepatit gibi akut bir karaciğer hastalığı seyrinde ortaya çıkabildiği gibi, az sayıdaki vakada Wilson hastalığı, otoimmün hepatit ya da kronik hepatit B'nin reaktivasyonu gibi altta yatan kronik bir karaciğer hastalığının ilk bulgusu olarak da görülebilmektedir.

#### 2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği: Sınıflama

1993 yılında O. Grady ve arkadaşları AKY'ni ensefalopatinin gelişme zamanına göre 3 kısma ayırmışlardır. Buna göre ensefalopati kliniği ilk 1-7. günlerde ortaya çıkıyorsa hiperakut, 8-28. günler arasında oluşuyorsa akut ve 5-12. haftalar arasında görülüyorsa subakut karaciğer yetmezliği olarak tanımlanmaktadır (10). Bu sınıflama hastalığın prognozunu tayini ve karaciğer transplantasyonu açısından önem kazanmaktadır.

#### 2.1.2. Akut Karaciğer Yetmezliği: Etiyoloji

Akut karaciğer yetmezliğinin pek çok nedeni bulunmaktadır. Ancak ilaçlara bağlı karaciğer hasarı ve viral hepatitler belirlenebilen tüm nedenlerin %80-85'ni oluşturur. Nedenlerin dağılımı coğrafik bölgelere göre değişir. Birleşik Devletler'de ve Avrupa'da ilaca, özellikle asetaminofene bağlı karaciğer hasarı baskın neden iken gelişmekte olan ülkelerde akut viral hepatit en sık etiyolojidir. Etiyolojinin biran önce belirlenmesi bazı durumlarda yaşamsal öneme sahiptir. Örneğin parasetamol toksisitesine bağlı olgularda glutatyon depolarını düzeltmeye yönelik asetilsistein (11), herpes zoster ve sitomegalovirüse bağlı olgularda sırasıyla asiklovir ve

gansiklovir (12), mantar zehirlenmesi olgularında ise penisilamin tedavisi (13) oldukça etkilidir. AKY'nin bilinen en sık nedenleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Akut karaciğer yetmezliğinin bilinen nedenleri

---

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Viral hepatit</b> Hepatit A, B, C, D ve E virüsleri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Toksinler</b> Mantar zehirlenmesi Organik çözücüler Fosfor</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Diğer virüsler</b> Herpesvirüs 1, 2 ve 6 Adenovirüs Epstein-Barr virüsü Sitomegalovirüs</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Metabolik bozukluklar</b> Gebeliğin akut yağlı karaciğeri Reye sendromu</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İlaçlar</b> Asetaminofen Halotan İzoniazid Rifampin NSAİİ Sulfonamidler Tetrasiklin Sodyum valproat Amiodaron</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Vasküler olaylar</b> Akut dolaşım yetmezliği Budd-Chiari sendromu Venookluzif hastalık</li><li>• <b>Diğer bozukluklar</b> Wilson hastalığı Otoimmün hepatit Tümör invazyonu Karaciğer transplantasyonu ve birincil graft işlev bozukluğu</li></ul>

---

### 2.1.3 Akut Karaciğer Yetmezliği Patogenez

Akut karaciğer yetmezliği, hepatositlerin tek başına veya kombine halde sitotoksik ve sitopatik hasarı sonucu ortaya çıkar. Sitotoksikite hepatit A gibi virüsler, ilaçlar veya onların metabolitleri ya da çevresel toksinler tarafından direkt hasar şeklinde oluşur. Bunun aksine sitopatik hasar, hepatit B virüs infeksiyonu ve idiyosenkratik ilaç reaksiyonunda olduğu gibi immünolojik mekanizmayla indirekt olarak gerçekleşir.

AKY'de iki histolojik patern görülmektedir. En sık görüleni masif hepatoselüler nekroz olup, tipik olarak viral infeksiyon ve ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkar. Histolojik incelemede normal hepatik çattının kaybıyla birlikte veya tek başına nekrotik hepatosit tabakaları gözlenir; bazı olgularda rejenerasyon odakları görülür. Karaciğer dokusunda yaygın nötrofil infiltrasyonu, immünolojik mekanizmayla oluşan olgularda ise lenfosit ve plazma hücreleri gözlenir. Eozinofiller genellikle idiyosenkratik ilaç reaksiyonu sonucu gelişen olgularda saptanır (14).

Diğer histolojik patern ise mikroveziküler yağlanmadır. Bu tablo gebeliğin yağlı karaciğeri, Reye sendromu, valproik asit ve tetrasiklin toksisitesi ya da kronik hepatit B virüs infeksiyonunun antinükleozid ajanlarla tedavisi esnasında gelişir. Mikroveziküler yağlanma, mitokondriyal yağ asidi ve amonyak metabolizmasının bozulması sonucu hepatositlerde yağ birikimi nedeniyle ortaya çıkar (14).

## 2.2. GAL Hepatiti

Kimyasal ajanlarla oluşturulan karaciğer hücre hasarı, hepatosit kaybına kadar giden bir takım ardışık kompleks olayların meydana gelmesine yol açabilir. Karaciğer hastalıklarıyla ilgili bir çok hastalığa ışık tutmak amacıyla karaciğer hastalıklarının patogenezi taklit edebilen bir çok kimyasal ajan kullanılmıştır. Deneysel hepatit modelleri arasında GAL ile yapılan karaciğer hasarı, morfolojik ve fonksiyonel özellikleri itibariyle insanlarda görülen viral hepatitlerdeki karaciğer hasarına çok benzerdir (1).

Karaciğer hasarı için GAL uygun bir deneysel modeldir (15,16). GAL hepatositlerde protein sentezini azaltan, RNA sentezinde inhibisyona yol açan bir hepatotoksik ajandır ve hem in vivo (16,17) hem de in vitro (18,19) deneylerde hepatosit ölümünü teşvik eder. Uzun süreli ve yüksek dozlarda GAL uygulanması histolojik olarak tanımlanabilen karaciğer hasarını şiddetlendirir ve transaminazlar gibi hücre içi maddelerin serbest kan dolaşımına geçmesine yol açar.

Hepatosit kaybında esas rol oynayan mekanizma hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ve adenozin trifosfat (ATP) seviyeleridir. Hücre geçirgenliğinin artması sonucunda hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyeleri artarak endonükleaz aktivasyonuna yol açar ve bu durum DNA kırıklarına sebep olur. Kalsiyumdaki artış ATP tüketiminin ve  $Ca^{+2}$  pompasındaki yetersizliğin bir sonucudur. Hücresel ATP miktarı hasarın şiddetini, nekroz veya apoptoz gibi hasarın tipini belirler (20). Nekroz genel olarak, membran

seçiciliğinde ve iyon pompa aktivitesindeki azalma gibi özelliklerle tanımlanmaktadır. Nekroz durumunda plazma membranındaki hasara ilaveten, mitokondri ve diğer organel membranlarında da hasar oluşmaktadır. Oluşan bu membran hasarları sitozoldeki  $Ca^{+2}$  artışı ile aktive edilen endojen fosfolipazların aktivasyonuna bağlı olabilir.

GAL'in hepatositlerde onkotik nekrozu teşvik ettiği in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (16). Son çalışmalar GAL'nin hepatositlerde apoptoza da neden olduğunu göstermektedir. GAL hepatositlerde uridin-5-difosfat (UDP) heksozaminlere ve UDP-N-asetil heksozaminlere metabolize edilir. Bu durumda, hücrelerde üridin trifosfat tüketimi (UTP) meydana gelir ve bu tüketim protein sentezinde ve transkripsiyonda geçici bir engellemeye neden olur (16,18,21). Sonuç olarak GAL'nin önemli membran proteinlerinin sentezini engelleyerek, hücre ölümüne neden olduğu düşünülmektedir.

GAL sıçanlarda direkt olarak mast hücre aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive olan mast hücreleri histamin salgılamak suretiyle bağırsak geçirgenliğini artırır. Bağırsaktan salınan bakteriyel ürünler Kupffer hücrelerini aktive eder. Aktive olan Kupffer hücreleri tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinlerin salınımına yol açar (16). Galaktozamin hepatositlerde mRNA ve protein sentezini, bu hücrelerin TNF- $\alpha$  aracılı olaylara hassasiyetini artırarak inhibe ederken hücre ölümüne yol açan sinyal yollarını da aktive eder. Hücreler ilk olarak apoptoz yoluyla ölmeye başlar ve takiben inflamatuvar hücreler karaciğer parankim dokusuna girerek nekrotik alanları oluşturur (22).

TNF- $\alpha$  başlıca makrofajlar, monositler ve karaciğerdeki Kupffer hücreleri tarafından dolaşıma salınan proinflamatuvar bir sitokindir. TNF- $\alpha$ 'nın hücre büyümesini düzenlemesi ve araşidonik asit sentezini uyarması gibi birçok etkisi vardır. GAL Kupffer hücrelerinden TNF- $\alpha$  salınımına yol açarak nötrofillerin karaciğere toplanmasına neden olur (16). TNF- $\alpha$ 'nın  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , ve diğer toksik metabolitleri üretmek için nötrofilleri uyardığı bilinmektedir (23,24).

### **2.3. Probiyotikler**

Probiyotikler ilk olarak sağlıklı bireylerin barsak florasıyla hastalıklı bireylerin barsak florasının karşılaştırılmasıyla bulunmuş ve yeterli miktarlarda tüketildiğinde

konakçıya sağlık kazandıran yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (25). İlk olarak Elie Metchnikoff yıllar önce, Bulgar köylülerinin uzun yaşadığını fark etmiş ve bunu araştırdığında bu insanların bol miktarda yoğurt tükettiklerini görüp yoğurdu incelediğinde canlı bakterilerle karşılaşmış ve bunlara *Lactobacillus bulgaricus* adını vermiştir (26).

Yüzyıllardır insanların beslenmesinde yerleri olmasına karşın, son yıllarda probiyotiklerin insan sağlığı ve tedavisindeki önemi ile ilgili araştırma sayısı giderek artmaktadır. 1974 yılında Mann ve Spoering, *Lactobacillus sp.* ile fermente edilmiş yoğurt tüketen kişilerin serum kolesterol düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermiştir (27). Probiyotiklerin bağışıklık sistemine yaptığı olumlu etki 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından resmen bildirilmiştir (28).

Probiyotikler çeşitli etki mekanizmalarıyla insan sağlığına olumlu etkide bulunmaktadır (29). Bunlar;

- Barsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabete girerek patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellerler
- Bakteriyosin olarak da bilinen antimikrobiyal maddeler üretirler, patojen mikroorganizmaların sayısını azaltırlar
- Sindirim için gerekli bazı enzimleri salgılayarak sindirime yardımcı olurlar
- Çeşitli toksin, mutojen, karsinojen konsantrasyonunu azaltırlar veya elimine ederler
- Doğumsal ve adaptif immün savunma mekanizmalarını modüle ederler
- Çeşitli besin, antioksidan, büyüme, koagülasyon faktörlerini salgırlar
- Apoptozisi uyarırlar

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğu laktik asit grubundan olup en çok laktobasiller ve bifidobakterilerdir. Günümüzde probiyotik preparatları toz, tablet, kapsül, granül ve pelet şeklinde kullanılabilir. Tablo 2'de probiyotik olarak kullanılan başlıca bakteriler gösterilmiştir (30).



**Tablo 2.** Probiyotik olarak sıklıkla kullanılan bakteriler

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp.</i>	<i>B. animals</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

### 2.3.1 Kefir

Kefir, çok eski yıllardan beri özellikle Kafkasya bölgesinde yapılan, bugün ise Avrupa ve Amerika ülkelerinde ticari maksatla imal edilen köpüklü, koyu kıvamlı, hafif ekşimsi bir içecektir. Kefir asit ve alkol fermentasyonunun birlikte gelişmesiyle elde edilmektedir. Fermentasyon oluşumunda süt asiti bakterileri ve mayalar bir arada etkili olmaktadır. Yapımı sırasında kefirde bulunan maya ve laktik asit bakterilerinin metabolik aktiviteleri sonucu süt asidi, etil alkol ve karbondioksit oluşur (31). İçerdiği karbondioksit nedeniyle de köpürme özelliğine sahiptir. Düşük ısı derecelerinde mayaların etkisiyle alkol fermentasyonu, yüksek ısı derecelerinde ise laktik asit bakterilerinin etkisiyle laktik fermentasyon hakim olarak gelişir.

Bileşimi itibariyle yoğurtla benzerlik gösteren kefirin kapsamında çeşitli bakteriler (Lactobasil türü bakteriler ağırlıktadır) ve mayalar bulunmaktadır. Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar Tablo 3’de verilmiştir (32).

### 2.3.2. Kefirin İçeriği ve Kefir Granülleri

Kefir, granül olarak adlandırılan beyaz veya sarı renkli, çapı 1-2 mm’den 3-6 mm’ye kadar değişen karnabahar ya da patlamış mısır görünümündedir (Şekil 1). Bu granüller kazein ve kompleks şekerlerin bakteri-maya karışımıyla yaptıkları yığınları içerir. Kefir taneleri polisakkaritten oluşmuş olup içerisinde bir miktar kazein ve yağ vardır (33). Taneler içerik olarak kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Bu flora içerisinde laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar, asetik asit bakterileri,

homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri bulunur ve simbiyotik bir yaşam tarzı sürerler. Kaynağına bağlı olmak üzere kefir tanesindeki yerleşik mikroorganizmaların sayısı, cinsi ve türü değişebilir.



**Şekil 1.** Kefir tanesi

Kefir granülleri % 90 su, % 3,2 protein, % 0,3 yağ, % 5,8 azotsuz öz madde ve % 0,7 oranında kül içerir (32). Kefir yararlı bakteri ve mayalara ek olarak vücut için son derece gerekli olan esansiyel aminoasitler ve mineraller de içermektedir. Kefirdeki tüm proteinler tamamen sindirildiğinden vücut tarafından kolaylıkla kullanılır. Minerallerden kalsiyum, fosfor ve magnezyumu yüksek oranda içermektedir. Ayrıca B12, B1, K vitamini ve biotin açısından da zengindir.

**Tablo 3.** Kefirin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar

Mikroorganizma Grupları	Mikroorganizma Türleri	Bulunuş Oranları
Laktobasiller	<i>L. acidophilus</i>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>9</sup> /gr
	<i>L. helveticus</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. kefir</i>	
	<i>L. brevis</i>	
	<i>L. buchneri</i>	
Koklar	<i>S. lactis</i>	10 <sup>6</sup> /gr
	<i>S. lactis subsp. diacetylactis</i>	
	<i>S. cremoris</i>	
	<i>Leuconostoc kefir</i>	
	<i>L. mesenteroides</i>	
Asetik asit bakterileri	<i>Acetobacter aceti</i>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup> /gr
Mayalar	<i>Candida kefir</i>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> /gr
	<i>C. pseudotropicalis</i>	
	<i>C. valida</i>	
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	
	<i>K. lactis</i>	
	<i>K. bulgaricus</i>	
	<i>Saccharomyces unisporus</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>Candida tenuis</i>	

### 2.3.3. Kefirle Yapılan Çalışmalar

Kefirin içeriğinde bulunan mikroorganizmalar laktik asit, antibiyotik ve antibakterisit üretirler. Daha önce yapılan çalışmalar kefirin hayvanlarda antibakteriyel, immunolojik ve anti-tümör etkilerinin olduğunu göstermiştir (34,35,36).

Furukawa ve ark. kefir tanelerinin suda çözünebilir ve suda çözünemeyen polisakkarit fraksiyonlarının farelerde Lewis akciğer karsinomu ve B16 melanoma hücrelerine karşı etkisini araştırmışlardır. Suda çözünebilir fraksiyonunun pulmoner metastazlara karşı koruyucu, ancak melanoma hücrelerinin metastazına karşı ise az etkileri olduğunu, suda çözünemeyen fraksiyonun ise melanoma metastazını inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (37).

Kefirin antioksidan etkisi de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Güven ve ark. farelerde karbondioksit ile indüklenen oksidatif hasarda kefirin redükte glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeylerini artırarak, lipid peroksidasyonunu ise azaltarak vitamin E'den daha koruyucu etki gösterdiğini saptamışlardır (8).

Kefirin farelerde antiinflamatuar etkisi, pamukla indüklenen granülom dokusu üzerinde çalışılmış, inflamatuvar süreçte kefir süspansiyonlarının % 41, kefirle hazırlanan fermente sütün % 44, kefiran ekstraktının ise % 34 inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (38).

Kefirin fare modelinde Th2 sitokinleriyle kontrol edilen bir Th1 cevabını doza bağımlı şekilde indüklediği gösterilmiştir (39). Bu çalışmada kefir mikroflorasıyla fermente edilen sütün elde edilen ürünün, fare ince barsak epitel hücrelerinde IL-6 sekresyonunu up-regüle ettiği, kalın ve incebarsak lamina propriasında IgA hücre sayısını ve IL-4, IL-10 ve IL-6 hücre sayılarını artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada kalınbarsakta immunglobulin ve sitokin oluşumunun ince barsak lamina propriasındaki kadar belirgin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, kefirin esas olarak ince barsaktan emilmesine ve kalın barsaktaki immun etkilerden daha çok solubl ekzopolisakkarit fraksiyonu olan kefiranın sorumlu olabileceğine bağlanmıştır.

Kefirle ilgili pek çok çalışma düzenlenmesine rağmen GAL hepatitinde kefir hiç kullanılmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda deneysel olarak GAL ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine kefirin antioksidan özelliğinin doku düzeyindeki etkileri, biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir

## 2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren maddelerdir (40,41). Organik ya da inorganik yapıda olabilen serbest radikallerin, eşleşmemiş elektronları nedeniyle, reaktiviteleri bir hayli yüksek, buna karşılık yarı ömürleri çok kısadır (42,43). Serbest radikallerin hedefi olan membran yapısında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri, oksidan ajanların arttığı ve antioksidan ajanların azaldığı veya yetersiz kaldığı durumlarda oluşan oksidatif strese maruz kalırlar. Sonuçta serbest radikaller hücrel hasar meydana getirirler (41,44,45).

İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen ( $O_2$ ), yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikali (SOR) akla gelmektedir. Fizyolojik şartlarda SOR; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için gereklidir.

Vücutta oluşan SOR ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur. Polimorfonükleer lökositlerin aktive olması yoluyla ortaya çıkan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimler,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , NO ve hipoklorik asit (HOCl) gibi reaktif ürünleri ile solunum patlaması oluşur (41,45,46). Aşırı reaktif bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirmek suretiyle kararsız (reaktif) bir atom haline gelmesine yol açabilirler.

Serbest radikaller hücrede DNA, protein, karbonhidrat ve lipit gibi önemli hücrel yapılara etkilidir. Hücre membranının yapısında bulunan glikolipit, fosfolipit ve gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için iyi bir hedeftir (44,45). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda, organizma oksidatif strese maruz kalmakta ve sonuçta hücrel metabolizma bozularak moleküler yıkım ve doku hasarı ortaya çıkmaktadır.

Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerinin artması ve bunların oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile DNA ve protein oksidasyonu sonucu olarak

hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artar ve hücreseel ölüm gelişir (45,47). Serbest radikaller ve serbest radikal tepkimeleri sonrası oluşan ürünler hücreseel yaşamı tehdit etmekte ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (48,49). Oksidatif strese yol açan faktörlerden kaçınılması birçok hastalığın oluşumunun engellenmesi ve progresyonunun yavaşlatılması açısından oldukça önemlidir.

## 2.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır :

A) Eksojen kaynaklar

- Alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler
- İyonize ve non iyonize radyasyon
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, solventler, hiperoksi, aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, anestezi maddeleri, sigara dumanı vs.

• Stres; strese katekolamin düzeyi artar ve artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi artmaktadır.

- Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri
- Sisplatin, doksorubisin, metotreksat, bleomisin, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar
- Metal iyonları

B) Endojen kaynaklar

- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs.
- Tetrahidroproteinler, katekolaminler, hidrokinonlar, tioller, gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu

• Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

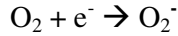
• Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)

- Mitokondriumda bulunan elektron transport sistemi
- Peroksizomlarda var olan enzimler
- İskemi, travma, intoksikasyon gibi durumların sonucu oluşan oksidatif stres

- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu
- Yaşlanma

## 2.6. Serbest Oksijen Radikal Türleri

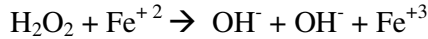
Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. İskemi, intoksikasyon, hemoraji, radyoaktivite maruziyetinde mitokondride aerobik oksidatif fosforilasyon etkilenir. Elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları meydana gelir. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit,  $O_2^-$ ) oluşturmaktadır (50,51).



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi veya  $O_2^-$ 'nin dismutasyonu ile  $H_2O_2$  oluşur (40).



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Bunlar geçiş metal iyonlarının bulunduğu ortamda kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin reaktifi olan ve biyolojik sistemlerde daha çok hasar meydana getiren hidroksil radikalini ( $OH^\cdot$ ) oluşturur (40).



Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan yukardaki tepkime de hücre için son derece toksik olan  $OH^\cdot$  oluşur (52).

## 2.7. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

### 2.7.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Lipidler; biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (47,52). Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir fenomendir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır (52). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO<sup>•</sup>) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (53). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni malondialdehid (MDA)'dir. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (54). MDA oluştuğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur.

### **2.7.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler**

Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir. Ancak protein ve nükleik asitler serbest radikal etkilerine karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır (55). DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (52). DNA molekülü hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin görüldüğü bilinmektedir (56).



## 2.8. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

### 2.8.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

**E Vitamini :** Vitamin E, lipid fazda çözünen zincir-kırıcı etkiye sahip bir antioksidandır. Dokularda Vitamin E aktivitesinin yaklaşık %90'ından sorumlu en aktif ve en yaygın formu  $\alpha$ -tokoferol'dür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (53,57). Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Hücre membranlarında  $O_2^-$ ,  $OH^-$  gibi radikalleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (58).

**C vitamini:** Ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalının doğrudan temizleyicisidir (58).

**Transferrin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (47).

**Bilirubin:** Serbest radikalleri tutar,  $O_2^-$  ve  $OH^-$  toplar (59,60).

**Albümin:** Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (59,60).

**Ürik asit:** Normal plazma konsantrasyonlarında  $O_2^-$ ,  $OH^-$  ve peroksil radikallerini temizlemektedir (59,60).

**Seruloplazmin:** SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını engeller (61).

**Piruvat:** Güçlü antioksidandır ve  $H_2O_2$  bağlayıcı özelliği vardır (62).

**Taurin:** Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltır. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir (63).

**$\beta$ -Karoten:** Vitamin A'nın prekürsörüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (56).

**Glutasyon:** Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden genetik bilgiye sahip olmadan karaciğerde tripeptid yapıda sentezlenmektedir. Glutasyon, oksidatif stresin

ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Redükte glutatyon (GSH) / okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalmaktadır. Proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutatyon; hücreleri oksidatif hasara karşı korur (64).

**Melatonin:** Primer olarak pineal bezde sentezlenen, özellikle gece salgılanan ve triptofandan sentez edilen bir hormondur. Lipofilik özelliği yüksek olup membranları kolaylıkla geçer. Organizmada yapılan ve tahrip edici özelliği çok yüksek olan hidroksil radikali temizler (65).

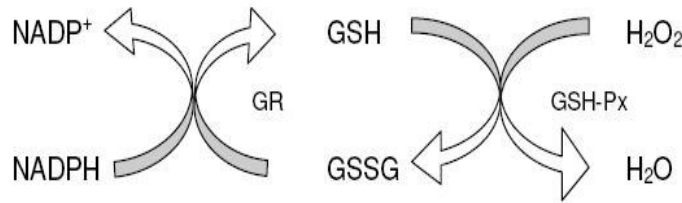
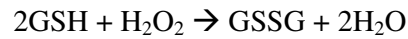
**Sistein:** Potent bir antioksidandır. Glutatyon sentezi için prekürsördür (41).

## 2.8.2. Enzimatik Antioksidanlar

### 2.8.2.1. Glutatyon Peroksidaz

GSH-Px yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda GSH'ı GSSG'ye çevrilir. Bu tepkimede  $H_2O_2$ 'yi yüksek özgüllük ile katalizleyerek detoksifiye eder (Şekil 2). GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda glutatyon peroksidaz enzimi  $H_2O_2$ 'i suya indirger. Daha sonra glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (64).

Tepkime aşağıda verilmiştir:

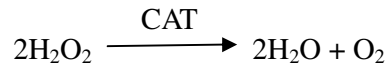


**Şekil 2:** Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz,  $H_2O_2$ =Hidrojen peroksit).

Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonda olması durumunda GSH-Px katalaza göre daha etkilidir (41).

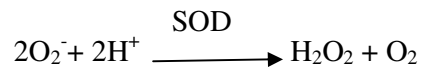
### 2.8.2.2. Katalaz

Katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir (53). Özellikle hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (66). Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (40). Ortamda oluşan  $H_2O_2$ 'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. Katalaz enzim aktivitesi, ortamda  $H_2O_2$  konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda; belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki  $H_2O_2$  konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (67). Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, etkilerinin benzer olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkili iken (52), GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir (41). Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



### 2.8.2.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizleyerek organizmayı toksik reaktif oksijen metabolitlerine karşı koruyan bir metalloenzimdir (68,69).



Spontan olarak bu tepkime oluşabilmektedir, SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar (70). Radikallere karşı hücreyi koruyan

savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir. Fizyolojik şartlarda metabolik aşamalarda  $O_2^-$  radikalının oluşumu oldukça fazladır.  $O_2^-$  radikalının hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutarak  $O_2^-$  seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri  $O_2^-$  radikallerinin etkilerinden korur (41).

### **3. MATERİYAL ve METOD**

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı ve çalışmamız Etik Kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

#### **3.1. MATERİYAL**

##### **3.1.1. Deneysel Hayvanları**

Bu çalışmada; 8-12 haftalık, 124–197 gr ağırlıkları arasında (ortalama 165 gr) 42 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) bulundurulmuş standard sıçan yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

##### **3.1.2. Kefirin Hazırlanması**

Kefir için 2 litre süt Isparta süt ürünleri fabrikasından temin edildi ve cam kavanoza kondu. Aynı gün süt ısı 25 C<sup>0</sup> olacak şekilde ısıtıldı ve içine hazır starter kefir kültüründen (kefir DC1 seri; 05223B 10001, Danisca Biolacta Sp. Poland) % 3 oranında eklenerek kavanozların ağızları kapatıldı. Daha sonra otoklavda 30 C<sup>0</sup> de 14 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra ürün filtreden süzülerek plastik kaba kondu ve + 4 C<sup>0</sup> de çalışma süresince kullanılmak üzere saklandı. Kefir çalışma süresince kullanımdan önce her defasında homojenize edildi.

### 3.1.3. Kullanılan Malzeme ve Aletler

**Tablo 4.** 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)

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Sıçanların Beslenme Modeli

Tüm sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi kullanılmıştır. Kontrol gruplarına 7 gün boyunca standart çeşme suyu verilmiştir. Deney gruplarına ise çeşme suyu yerine %10'luk ve %20'lik dilüsyonlarda kefir verilmiştir. Kefirin etkinliğinin bozulmaması açısından 12 saatte bir değiştirilmiştir. Tüm grupların içtikleri çeşme suyu ve kefir miktarı 12 saat arayla kontrol edilerek kaydedilmiştir. Ayrıca tükettikleri sıçan yemleri de günlük olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Sıçanlar, aşağıda ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi 3 grup 6'şarlı, 3 grupta 8'erli olmak üzere 6 gruba ayrıldı. 7 gün boyunca çeşme suyu veya kefirle ön tedavi verildi (Tablo 5).

Grup 1 ( Normal Kontrol ): İlk 7 gün çeşme suyu verildi. 7. gün, intraperitoneal (i.p.) olarak serum fizyolik (SF, 1 ml) uygulandı (n:6).

Grup 2 ( %10 Kefir Kontrol ): İlk 7 gün su yerine phosphate-buffered saline (PBS) ile dilüe edilmiş %10 kefir verildi. 7. gün i.p. olarak SF 1 ml uygulandı (n:6).

Grup 3 ( %20 Kefir Kontrol ): İlk 7 gün su yerine PBS ile dilüe edilmiş %20 kefir verildi. 7. gün i.p. olarak SF 1 ml uygulandı (n:6).

Grup 4 ( GAL ): İlk 7 gün çeşme suyu verildi. 7. gün, intraperitoneal (i.p.) olarak 1g/kg GAL uygulandı (n:8).

Grup 5 ( GAL + %10 Kefir ): İlk 7 gün su yerine PBS ile dilüe edilmiş %10 kefir verildi. 7. gün i.p. olarak 1g/kg GAL uygulandı (n:8).

Grup 6 ( GAL + %20 Kefir ): İlk 7 gün su yerine PBS ile dilüe edilmiş %20 kefir verildi. 7. gün i.p. olarak 1g/kg GAL uygulandı (n:8).

8. gün GAL ve SF injeksiyonundan 24 saat sonra sıçanların yaşamına son verilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Ön tedavide verilen kefir %10'luk ve %20'lik derişimlerde hazırlandı ve 12 saatte bir değiştirilerek hayvanların suluklardan içmesi sağlandı. 7. gün hepatit oluşturuju ajan olan GAL 1g/kg dozunda i.p. olarak uygulandı.

Deney başlangıcında ve 7. gün işlemlerinden önce sıçanların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları hayvanların ağırlıklarına göre yapıldı. 8. gün deneylerine başlamadan 24 saat önce katı besin, 2 saat önce de su alımları kesildi.

**Tablo 5.** Deney protokolü, günlere göre ilaç uygulamaları

GRUP	1 –7.Günler	7.Gün	
		→ 24 saat sonra	
Grup 1 (Normal Kontrol)	Çeşme suyu	SF (i.p.)	Ex
Grup 2 (%10 Kefir Kontrol)	%10 Kefir	SF (i.p.)	Ex
Grup 3 (%20 Kefir Kontrol)	%20 Kefir	SF (i.p.)	Ex
Grup 4 (GAL)	Çeşme suyu	GAL (i.p.)	Ex
Grup 5 (GAL + %10 Kefir)	%10 Kefir	GAL (i.p.)	Ex
Grup 6 (GAL + %20 Kefir)	%20 Kefir	GAL (i.p.)	Ex

GAL: 1 g/kg , SF: 1ml olarak verildi.  
i.p. : Intraperitoneal

### **3.2.3. Doku ve kan örneklerinin alınması**

Sakrifikasyon yapılan günün sabahı sıçanlar i.p. ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) 80 mg/kg + ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anesteziye edilerek orta hat insizyonu ile batinları açıldı. Vena cava inferiorundan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve total bilirubin düzeyleri, ticari kit kullanılarak otoanalizörde ölçüldü. Protrombin zamanı (PT) ve INR kromojenik yöntemle koagülometre cihazında tayin edildi. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için karaciğerden doku örnekleri alındı. Histopatolojik inceleme için karaciğerin sağ lobu %10'luk formaldehid içinde muhafaza edildi. Biyokimyasal çalışmalar için ise karaciğerin sol lobu alınarak doku örnekleri -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

### **3.2.4. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması**

#### **3.2.4.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler**

Karaciğer dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7,5, 0,2 mM Tris-HCL tamponu kullanıldı (53).

#### **3.2.4.2 Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması**

Karaciğer dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine 2 ml Tris-HCL tamponu eklendi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 2,5 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Dokular tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı artırılmadan eppendorf tüplerine kondu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan MDA seviyesi ve homojenat protein tayini (Lowry metodu ile) yapıldı (71).



Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant sağlandı. Ayrılan süpernatantlardan GSH-Px, CAT enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4 °C’ de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

### **3.2.5. Dokularda Biyokimyasal Analizler**

Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında karaciğer dokusunda myeloperoksidaz, TNF-alfa ve IL-10 aktiviteleri ELİZA ile çalışıldı. MDA seviyeleri HPLC yöntemiyle; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Glutatyon, Ellman reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak çalışıldı.

MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (72). Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (73), katalaz enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (74), GPX enzim aktivitesi Paglia metoduna göre çalışıldı (75).

### **3.2.6. Histopatolojik Analiz Yöntemleri**

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

Hepatosellüler hasar derecesi İshak ve ark. (76) tanımladığı skorlama sistemi kullanılarak yapıldı. Bu skorlama sistemine göre hepatosellüler hasar derecesi aşağıda verilen her birim için 0-4 arasında skorlanıp toplam skor elde edilerek hesaplandı.

- A: Periportal veya periseptal interface hepatit
- B: Birleşen nekroz
- C: Fokal litik nekroz, apoptoz ve fokal inflamasyon
- D: Portal inflamasyon

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 11.0 istatistik programında yapıldı. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma, gruplar arası farklılaşmanın öneminin tespiti için Tek Yönlü ANOVA testi kullanıldı. Varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa Post Hoc Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Deney grupları arasındaki histopatolojik 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. Sıçanların Gruplara Göre Tükettikleri Toplam Çeşme Suyu, Kefir ve Yem Miktarları

Sıçanların gruplara göre tükettikleri sıçan başı çeşme suyu, kefir ve sıçan yemi miktarları Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Sıçanların tükettikleri çeşme suyu, kefir ve sıçan yemi miktarları

Gruplar	Tüketilen çeşme suyu (ml)	Tüketilen %10 kefir (ml)	Tüketilen %20 kefir (ml)	Tüketilen sıçan yemi (gr)
Grup 1 (Normal Kontrol)	30			16
Grup 2 (%10K Kontrol)		40		17
Grup 3 (%20K Kontrol)			33	14
Grup 4 (GAL)	31			18
Grup 5 (GAL-%10K)		33		15
Grup 6 (GAL-%20K)			36	16

### 4.2. Sıçanlardaki Ağırlık Değişiklikleri

Tüm gruplarda sıçanların ortalama ağırlıklarında artış oldu. Normal Kontrol grubunun 2 nolu sıçanı ile %20 Kefir Kontrol grubunun 2 nolu sıçanı deney sonunda başlangıç ağırlıklarına göre azalma gösterdi. Sıçanların çalışmaya başlamadan ve sakrifikasyon öncesi ortalama ağırlıkları Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Çalışma başlangıcı ve sakrifikasyon öncesi sıçanların ortalama ağırlıkları

Gruplar	Çalışma öncesi (g)	Çalışma sonrası (g)	Ağırlık değişimi (%)
Grup 1 (Normal Kontrol)	167 ± 6	181 ± 11	6,59 ± 3,89
Grup 2 (%10K Kontrol)	169 ± 10	192 ± 9	12,23 ± 1,71
Grup 3 (%20K Kontrol)	170 ± 7	182 ± 10	5,56 ± 6,50
Grup 4 (GAL)	159 ± 6	178 ± 9	10,55 ± 1,55
Grup 5 (GAL-%10K)	158 ± 8	179 ± 9	11,47 ± 0,92
Grup 6 (GAL-%20K)	159 ± 6	174 ± 5	8,51 ± 1,48

### 4.3. Sıçanlardaki Karaciğer Ağırlık Değişiklikleri

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğer ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü. Karaciğer ağırlığı vücut ağırlığına oranlanarak bu değişim % olarak ifade edildi. Gruplar arasında karaciğer ağırlıkları ve karaciğer ağırlığının toplam vücut ağırlığına oranları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Karaciğer ağırlıkları Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Sıçanlardaki karaciğer ağırlık değişiklikleri

Gruplar	Karaciğer ağırlığı(g)	Karaciğer/kilo son oranı (%)
Grup 1 (Normal Kontrol)	6,86 ± 0,54	3,77 ± 0,16
Grup 2 (%10K Kontrol)	7,26 ± 0,08	3,80 ± 0,15
Grup 3 (%20K Kontrol)	6,62 ± 0,62	3,58 ± 0,18
Grup 4 (GAL)	7,64 ± 0,44	4,29 ± 0,19
Grup 5 (GAL-%10K)	7,91 ± 0,61	4,38 ± 0,17
Grup 6 (GAL-%20K)	7,10 ± 0,40	4,10 ± 0,24

### 4.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Serum ALT değeri GAL, GAL-%10K, GAL-%20K gruplarında, Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0,01). Serum ALT değeri GAL alan gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.

Serum AST değeri GAL-%10K grubunda Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0,01). Serum AST değeri GAL grubunda, Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0,05). AST değerleri GAL alan gruplar arasında farklılık göstermedi.

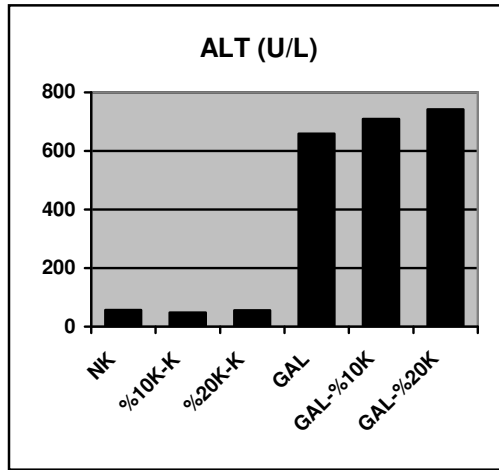
Serum ALP değeri GAL, GAL-%10K gruplarında, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0,01). ALP düzeyleri GAL alan gruplar arasında farklılık göstermedi.

Tablo 9’da gruplar arası serum AST, ALT ve ALP seviyeleri gösterilmiştir. Şekil 3’de ALT seviyeleri, Şekil 4’de AST seviyeleri, Şekil 5’de ALP seviyeleri grafik şeklinde gösterilmiştir.

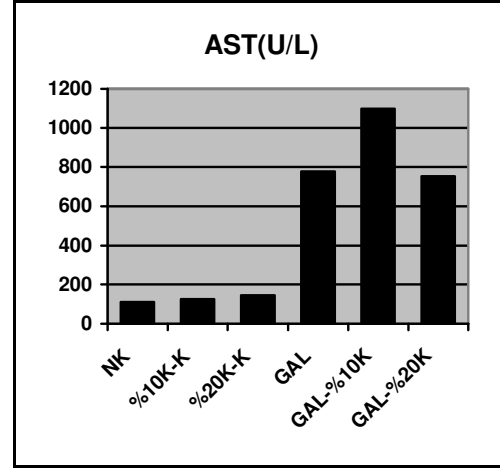
**Tablo 9.** Çalışma gruplarında karaciğer fonksiyon testleri

Gruplar	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
Grup 1 (Normal Kontrol)	112 ± 5	57 ± 6	272 ± 9
Grup 2 (%10K Kontrol)	125 ± 10	48 ± 1	255 ± 32
Grup 3 (%20K Kontrol)	146 ± 27	56 ± 3	231 ± 23
Grup 4 (GAL)	777 ± 182 <sup>1,2,3</sup>	659 ± 106 <sup>8</sup>	394 ± 27 <sup>9,10,11</sup>
Grup 5 (GAL-%10K)	1097 ± 246 <sup>4,5</sup>	710 ± 88 <sup>8</sup>	419 ± 26 <sup>12,13,14</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	753 ± 112 <sup>6,7</sup>	743 ± 121 <sup>8</sup>	342 ± 23

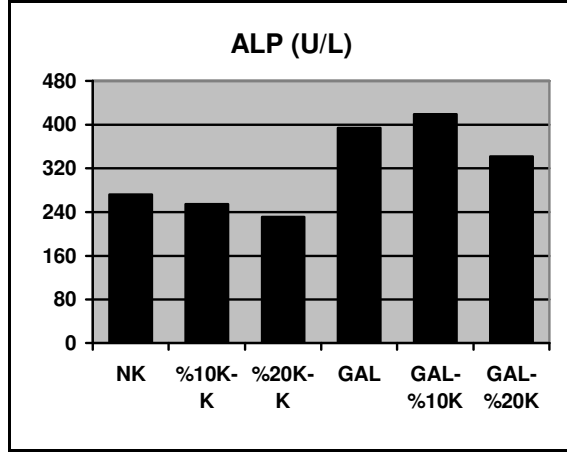
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup>Normal Kontrol grubuna göre p=0,03, <sup>2</sup>%10K Kontrol grubuna göre p=0,03, <sup>3</sup>%20K Kontrol grubuna göre p=0,04, <sup>4</sup>Normal Kontrol grubuna göre p=0,000, <sup>5</sup>%10K Kontrol ve %20K Kontrol grubuna göre p=0,001, <sup>6</sup>Normal Kontrol grubuna göre p=0,040, <sup>7</sup>%10K Kontrol grubuna göre p=0,046, <sup>8</sup>Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol grubuna göre p=0,000, <sup>9</sup>Normal Kontrol grubuna göre p=0,03, <sup>10</sup> %10K Kontrol grubuna göre p=0,006, <sup>11</sup> %20K Kontrol grubuna göre p=0,002, <sup>12</sup>Normal Kontrol grubuna göre p=0,006, <sup>13</sup> %10K Kontrol grubuna göre p=0,001, <sup>14</sup>%20K Kontrol grubuna göre p=0,000



**Şekil 3.** Serum ALT seviyelerinin gruplara göre dağılımı



**Şekil 4.** Serum AST seviyelerinin gruplara göre dağılımı



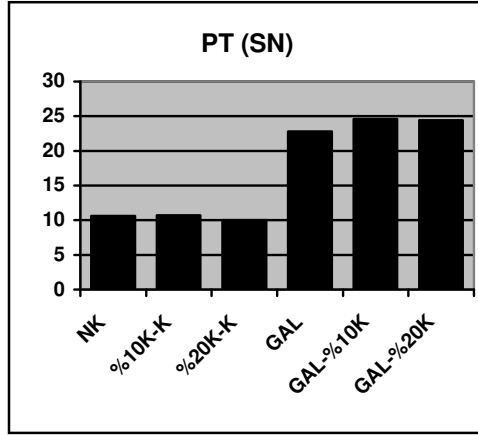
Şekil 5. Serum ALP seviyelerinin gruplara göre dağılımı

PT ve INR değerleri GAL, GAL-%10K, GAL-%20K gruplarında, Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ( $p=0,000$ ). PT ve INR değerleri Tablo 10'da, grafik olarak PT değeri Şekil 6'da, INR değeri Şekil 7'de gösterilmiştir.

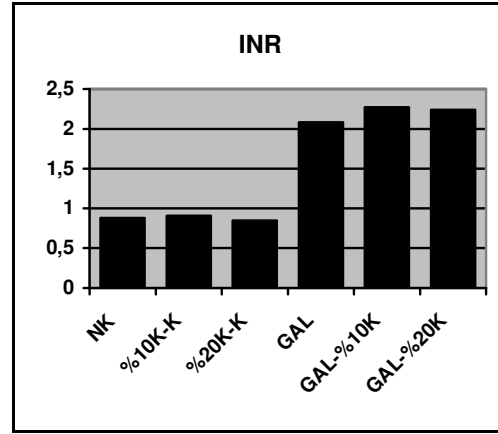
**Tablo 10.** Çalışma gruplarında karaciğer fonksiyon testleri

Gruplar	PT (sn)	INR
Grup 1 (Normal Kontrol)	$10,6 \pm 0,18$	$0,88 \pm 0,01$
Grup 2 (%10K Kontrol)	$10,7 \pm 0,26$	$0,91 \pm 0,03$
Grup 3 (%20K Kontrol)	$10,0 \pm 0,24$	$0,85 \pm 0,02$
Grup 4 (GAL)	$22,8 \pm 1,00^1$	$2,08 \pm 0,11^2$
Grup 5 (GAL-%10K)	$24,6 \pm 1,90^1$	$2,27 \pm 0,18^2$
Grup 6 (GAL-%20K)	$24,4 \pm 2,31^1$	$2,24 \pm 0,22^2$

Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup>Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre  $p=0,000$ , <sup>2</sup>Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre  $p=0,000$ ,



**Şekil 6.** Serum PT değerlerinin gruplara göre dağılımı



**Şekil 7.** Serum INR değerlerinin gruplara göre dağılımı

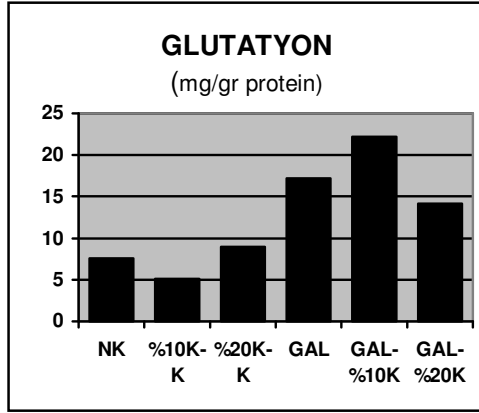
#### 4.5. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Düzeyleri

Karaciğer dokusunda glutasyon düzeyi GAL-%10K grubunda, %10K Kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılıklar görülmedi. Karaciğer dokusundaki glutasyon düzeyleri Tablo 11’de, grafik olarak Şekil 8’de gösterilmiştir.

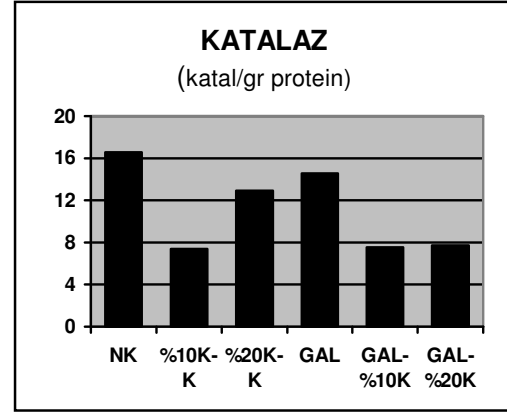
**Tablo 11.** Karaciğer dokusunda glutasyon düzeyleri

Gruplar	Glutasyon (mg/g protein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	7,59 ± 0,92
Grup 2 (%10K Kontrol)	5,13 ± 1,08
Grup 3 (%20K Kontrol)	8,96 ± 1,98
Grup 4 (GAL)	17,2 ± 3,56
Grup 5 (GAL-%10K)	22,2 ± 5,91 <sup>1</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	14,19 ± 4,00

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup> %10K Kontrol grubuna göre  $p=0,04$



**Şekil 8.** KC dokusunda glutatyon seviyelerinin gruplara göre dağılımı



**Şekil 9.** KC dokusunda katalaz seviyelerinin gruplara göre dağılımı

#### 4.6. Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzim Düzeyleri

Karaciğer dokusunda katalaz düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

SOD enzim düzeyleri GAL grubunda, %20K Kontrol grubuna göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı, %10K Kontrol grubuna göre  $p < 0,05$  düzeyine göre sınırda anlamlı olarak saptandı ( $p = 0,055$ ). SOD enzim düzeyleri açısından diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.

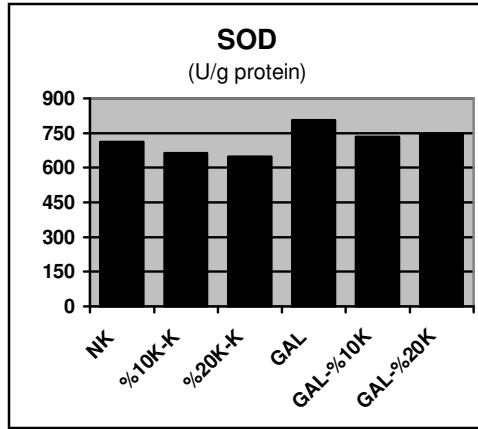
GSH-Px enzim düzeyleri GAL grubunda, Normal Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri Tablo 12'de, grafik olarak katalaz Şekil 9'da, SOD Şekil 10'da ve GSH-Px Şekil 11'de gösterilmiştir.



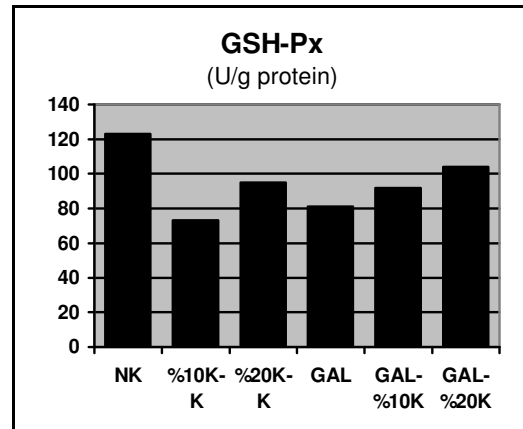
**Tablo 12.** Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri

Gruplar	Katalaz (k/g protein)	SOD (U/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	16,6 ± 6,1	713,79 ± 16,7	123,6 ± 5,4
Grup 2 (%10K Kontrol)	7,40 ± 1,7	664,03 ± 17,3	73,6 ± 9,1
Grup 3 (%20K Kontrol)	12,9 ± 5,2	648,26 ± 48,6	95,5 ± 18,0
Grup 4 (GAL)	14,6 ± 2,8	807,78 ± 39,3 <sup>1,2</sup>	81,2 ± 4,7 <sup>3</sup>
Grup 5 (GAL-%10K)	7,52 ± 1,2	733,03 ± 35,18	92,5 ± 6,6
Grup 6 (GAL-%20K)	7,69 ± 1,8	746,24 ± 28,2	104,0 ± 8,8

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup>%20K Kontrol grubuna göre p=0,025, <sup>2</sup> %10K Kontrol grubuna göre p=0,055, <sup>3</sup>Normal kontrol grubuna göre p=0,03



**Şekil 10.** KC dokusunda SOD seviyelerinin gruplara göre dağılımı



**Şekil 11.** KC dokusunda GSH-Px seviyelerinin gruplara göre dağılımı

#### 4.7. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri

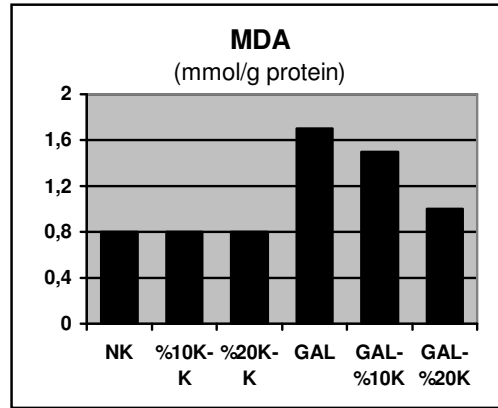
Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri GAL ve GAL-%10K grubunda, Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptandı (p=0,000). GAL-%20K grubunda, GAL ve GAL-%10K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı (p=0,000).

Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri Tablo 13'de, grafik olarak Şekil 12'de gösterilmiştir.

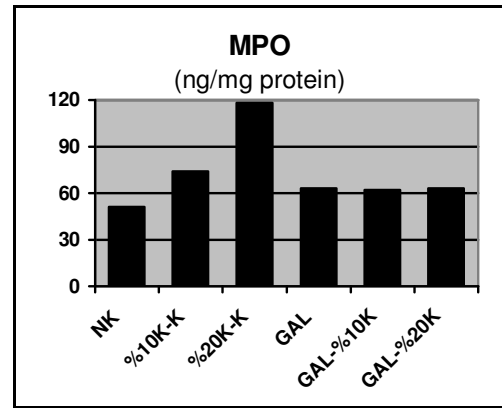
**Tablo 13.** Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Gruplar	MDA(mmol/g protein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	0,81 ± 0,05
Grup 2 (%10K Kontrol)	0,85 ± 0,10
Grup 3 (%20K Kontrol)	0,86 ± 0,05
Grup 4 (GAL)	1,74 ± 0,06 <sup>1</sup>
Grup 5 (GAL-%10K)	1,56 ± 0,06 <sup>1</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	1,05 ± 0,05 <sup>2</sup>

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup>Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre p=0,000, <sup>2</sup>GAL ve GAL-%10K gruplarına göre P=0,000



**Şekil 12.** KC dokusunda MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı



**Şekil 13.** KC dokusunda MPO düzeylerinin gruplara göre dağılımı

#### 4.8. Karaciğer Dokusunda MPO Düzeyleri

Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. MPO düzeyleri Tablo 14'de, grafik olarak Şekil 13'de gösterilmiştir.

**Tablo 14.** Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi

Gruplar	MPO (ng/mg protein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	51,19 ± 5,7
Grup 2 (%10K Kontrol)	74,70 ± 9,0
Grup 3 (%20K Kontrol)	118,6 ± 16,2
Grup 4 (GAL)	63,19 ± 8,5
Grup 5 (GAL-%10K)	62,13 ± 9,2
Grup 6 (GAL-%20K)	63,44 ± 25,4

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

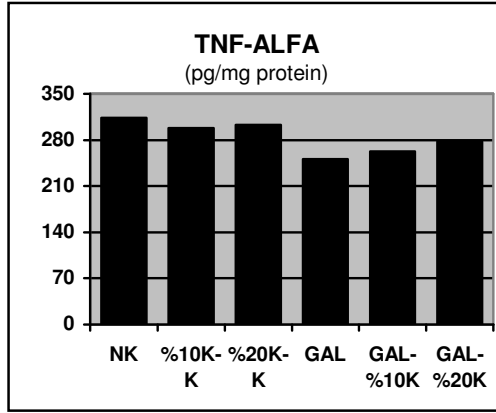
#### 4.9. Karaciğer Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyleri GAL grubunda, Normal Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı ( $p < 0,01$ ). GAL grubunda, %10K Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ( $p < 0,05$ ). GAL-%20K grubunda, Normal Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ( $p < 0,01$ ). GAL-%20K grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ( $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$  düzeyleri Tablo 15’de, grafik olarak Şekil 14’ de gösterilmiştir.

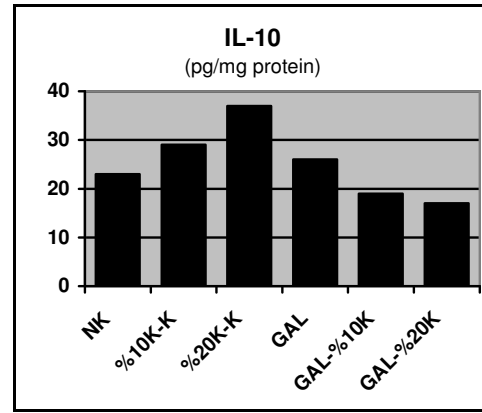
**Tablo 15.** Karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyleri

Gruplar	TNF- $\alpha$ (pg/mgprotein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	314,72 ± 2,52
Grup 2 (%10K Kontrol)	298,15 ± 3,84
Grup 3 (%20K Kontrol)	303,19 ± 3,88
Grup 4 (GAL)	251,71 ± 12,39 <sup>1,2,3</sup>
Grup 5 (GAL-%10K)	263,49 ± 10,60 <sup>4,5</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	278,86 ± 9,68

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup>Normal Kontrol grubuna göre  $p=0,000$ , <sup>2</sup>%20K Kontrol grubuna göre  $p=0,005$ , <sup>3</sup>%10K Kontrol grubuna göre  $p=0,013$ , <sup>4</sup>Normal Kontrol grubuna göre  $p=0,005$ , %20K Kontrol grubuna göre  $p=0,048$



Şekil 14. KC dokusunda TNF- $\alpha$  seviyelerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 15. KC dokusunda IL-10 seviyelerinin gruplara göre dağılımı

#### 4.10. Karaciğer Dokusunda IL-10 Düzeyleri

Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri GAL-%10K grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ( $p < 0,01$ ). GAL-%20K grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı ( $p < 0,01$ ). IL-10 düzeyleri Tablo 16'da, grafik olarak Şekil 15'de gösterilmiştir.

Tablo 16. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri

Gruplar	IL-10 (pg/mgprotein)
Grup 1 (Normal Kontrol)	23,04 $\pm$ 2,8
Grup 2 (%10K Kontrol)	29,31 $\pm$ 3,3
Grup 3 (%20K Kontrol)	37,52 $\pm$ 4,2 <sup>3</sup>
Grup 4 (GAL)	26,19 $\pm$ 4,7
Grup 5 (GAL-%10K)	19,18 $\pm$ 1,5 <sup>1</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	17,05 $\pm$ 0,7 <sup>2</sup>

Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. <sup>1</sup> %20K Kontrol grubuna göre  $p=0,004$ , <sup>2</sup> %20K Kontrol grubuna göre  $p=0,001$ , <sup>3</sup> Normal Kontrol grubuna göre  $p=0,056$

#### 4.11. Histolojik Değerlendirme

Sıçan gruplarında karaciğerin histolojik olarak değerlendirilmesinde, GAL alan gruplarda almayanlara göre anlamlı düzeyde nekroz saptandı ( $p < 0,01$ ). Kontrol grupları arasında ve GAL alan gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık görülmedi.

Hepatosellüler hasar derecesi İshak ve ark. (76) tanımladığı skorlama sistemi kullanılarak yapıldı. Sıçanların gruplara göre hepatosellüler hasar dereceleri Tablo 17’de gösterilmiştir.

**Tablo 17.** Sıçanların gruplara göre hepatosellüler hasar derecesi

<b>Gruplar</b>	<b>Karaciğer histolojisi Median (min-max)</b>
Grup 1 (Normal Kontrol)	0 (0-1)
Grup 2 (%10K Kontrol)	0 (0-2)
Grup 3 (%20K Kontrol)	0,5 (0-2)
Grup 4 (GAL)	4 (3-5) <sup>1</sup>
Grup 5 (GAL-%10K)	3 (2-5) <sup>1</sup>
Grup 6 (GAL-%20K)	4 (4-5) <sup>1</sup>

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. <sup>1</sup>Normal Kontrol, %10K Kontrol ve %20K Kontrol gruplarına göre p<0,01,

## 5.TARTIŞMA

Karaciğer vücuttaki konumu ve metabolik aktivitesi itibariyle, bir çok fonksiyonu üstlenen hayati öneme sahip önemli bir organdır. Bağırsaktan emilime uğrayan hemen hemen bütün maddeler, esas dolaşıma geçmeden önce karaciğerden geçer. Bu maddelerden hepatotoksik ajanlar karaciğere geldiklerinde, ya metabolik değişime uğrayarak veya doğrudan hepatosit hasarına yol açarlar. Hepatosellüler hasar ise klinik olarak karaciğer yetmezliği şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Akut karaciğer yetmezliği, önceden herhangi bir karaciğer hastalığı bulunmaksızın karaciğer fonksiyonlarının aniden ve ciddi bir şekilde bozulmasıyla karakterize, sıklıkla ensefalopatinin eşlik ettiği, potansiyel olarak geri dönüşümlü olabilen bir hastalıktır. Mortalitesi yüksektir ve kanıtlanmış bilinen tek tedavi seçeneği karaciğer transplantasyonudur. Son zamanlarda karaciğer yetmezliği tedavisi için çeşitli modeller üzerinde deneysel çalışmalar yapılmaktadır.

GAL akut hepatit oluşturmak için kullanılan toksik bir maddedir (77). GAL uygulaması ile oluşan morfolojik ve biyokimyasal değişimler karaciğere özgü olduğundan bir çok maddenin karaciğeri koruyucu etkisinin araştırılmasında GAL ile oluşturulan karaciğer hasar modeli tercih edilmektedir. GAL'in karaciğere özgü toksisite göstermesinin nedeni, hepatositlerin GAL'ni metabolize eden galaktokinaz ve galaktoz-1-P-Üridil transferaz enzimlerini bolca üretiyor olmasıdır. Diğer organlar GAL'den etkilenmezler (78,5). Karaciğere özgü toksisite gösteren bu maddenin uygulanması ile, RNA'nın hasar görmesi ve protein, glikojen, nükleik asid gibi makromoleküllerin biyosentezinin durması (79), hücre içi kalsiyum homeostazının bozulması (77) gibi değişimler hepatositlerin hasar görmesine ve hücre ölümünün meydana gelmesine sebep olur (78,18).

Biz bu çalışmada deneysel olarak, GAL ile oluşturulmuş akut karaciğer yetmezliği modelini seçtik. Hepatosellüler hasarın oluşup oluşmadığını ve hasarın derecesini, karaciğer fonksiyon testleriyle ve histopatolojik olarak değerlendirdik. Tek doz 1g/kg dozunda GAL i.p. verildikten 24 saat sonra yapılan sakrifikasyon işlemi sonrasında, biyokimyasal olarak bakılan karaciğer fonksiyon testlerinden AST, ALT, ALP, PT ve INR değerlerini Tablo 9 ve Tablo 10'da görüldüğü gibi hepatosellüler hasar belirteci olarak belirgin yüksek olarak saptadık. GAL alan gruplarda karaciğerin histopatolojik olarak incelenmesi de bu bulguları destekler

nitelikteydi. Sonuçta GAL verdiğimiz grupların hepsinde akut karaciğer yetmezliğinin ortaya çıktığını gösterdik.

Kefirle ilgili bugüne kadar birçok çalışma yapılmasına rağmen GAL hepatitinin önlenmesinde kefir kullanılmamıştır. GAL hepatitinin önlenmesinde probiyotik ürün olarak kefiri seçmemizin nedeni, ülkemizde üretilmesi, yaygınlaştırılabilir ve hoş tadı olan bir içecek olmasıdır.

GAL hepatitinde kefirin koruyucu etkinliğini araştırmak için sıçanlara kefiri %10'luk ve %20'lik derişimlerde verdik. Biyokimyasal olarak karaciğer fonksiyon testlerine baktığımızda GAL ile beraber kefir alan gruplarda AST, ALT, ALP, PT ve INR değerlerinin, sadece GAL alan gruba daha yüksek olduğunu saptadık. Özellikle %10 kefir alan grupta, ALT değeri dışında diğer testlerin, %20 kefir alan gruba göre daha yüksek olduğu ortaya çıktı. Sonuçta biyokimyasal olarak karaciğer fonksiyon testlerine baktığımızda, kefirin koruyucu etkisinin olmadığını bilakis GAL ile beraber verildiğinde hepatosellüler hasarı artırdığını söyleyebiliriz.

GAL'ın indüklediği karaciğer hasarının mekanizması, lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranının hasara uğraması ve geçirgenliğinin artması nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir (80). Lipid peroksidasyonunun tipik bir göstergesi olan MDA düzeylerinin, GAL ile yapılan daha önceki çalışmalarda arttığı gösterilmiştir (80,81,82). Bizde bu çalışmada MDA düzeylerini GAL alan gruplarda önceki çalışmaları doğrular bir şekilde artmış olarak saptadık. Kefirin koruyucu etkinliğine baktığımızda, MDA düzeylerinin kefir alan gruplarda düştüğünü, özellikle %20 kefir alan grupta bu düşüşün daha belirgin olduğunu saptadık ( $p<0,01$ ). Sonuç olarak kefirin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olduğunu ve bu etkisinin %20'lik derişimde daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Non-enzimatik antioksidan sistemin bir parçası olan glutatyon düzeylerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Çalışmamızda enzimatik anti-oksidan parametrelerden CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerine bakıldı. Bilindiği üzere CAT ve GSH-Px enzimleri  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya dönüştürerek ortadan kaldırırken, SOD enzimi  $O_2^{\cdot-}$  radikalini  $H_2O_2$ 'ye dönüştürerek ortadan kaldırır. Ortamda  $H_2O_2$ 'in artmış olması GPX ve katalaz enzim aktivitelerini,  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin artması SOD enzim aktivitesini dolaylı olarak artırmaktadır.

Katalaz enzim aktivitesine baktığımızda gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kefir alan gruplarda katalaz düzeylerinin biraz daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlendi.

Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri GAL grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanırken ( $p<0,05$ ), %10K Kontrol grubuna göre sınırdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.

Karaciğer dokusunda GSH-Px enzim düzeyleri GAL grubunda, Normal Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı. GAL grubuna %10K ve %20K eklendiğinde GSH-Px düzeylerinin biraz daha yükseldiği gözlemlendi.

Çalışmamıza enzimatik anti-oksidan düzeyde baktığımızda kefirin CAT ve SOD enzim düzeylerinde beklenen antioksidan etkisinin olmadığını, GSH-Px düzeyinde de anlamlı düzeyde olmasa da kefirin minimal koruma sağladığını söyleyebiliriz.

MPO nötrofil infiltrasyonunun bir belirteçidir. Serbest radikaller dokulara olan doğrudan hasar yapıcı etkilerine ilaveten, lökositlerin hasarlı dokuya toplanmasını sağlayarak doku hasarının aktive nötrofiller üzerinden daha da kötüleşmesine neden olurlar (83).

Yaptığımız bu çalışmada MPO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

TNF- $\alpha$ , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. Hepatotoksik ilaçların neden olduğu hepatosellüler hasar ve hücre nekrozunda TNF- $\alpha$ 'nın etkili olduğuna dair pek çok deneysel kanıt vardır. Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF- $\alpha$ 'nın, akut fulminan hepatitte hücre yıkımında rol aldığı düşünülmektedir (84).

Bazı otörler, anti-TNF- $\alpha$  antikorumun GAL + Lipopolisakkarid (LPS)'in indüklediği fulminan karaciğer yetmezliğinde koruyucu etkisinin olduğunu ve mortaliteyi azalttığını göstermişlerdir (85). Pleotropik proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ , doku hasarına cevap olarak hızlı bir şekilde üretilir (86). Artmış TNF- $\alpha$  seviyesi histolojik hepatik nekroz ve artmış serum aminotransferaz seviyeleriyle direkt olarak korele bulunmuştur (87).

Bizim çalışmamızda TNF- $\alpha$  düzeyleri GAL alan grupda, NK ( $p<0,01$ ), %10K Kontrol ( $p<0,05$ ) ve %20K Kontrol ( $p<0,01$ ) gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı. Ayrıca GAL-%10K alan grupda, NK ( $p<0,01$ ) ve %20K Kontrol ( $p<0,05$ ) gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı.

Tetsufumi Nakama ve ark. yaptığı çalışmada (88), sıçanlara GAL + LPS injeksiyonundan sonra, karaciğer dokusunda bakılan TNF- $\alpha$  düzeylerinin 2. saate



maksimum düzeye ulaştığını, ilerleyen saatlerde TNF- $\alpha$  düzeylerinin düştüğünü göstermişlerdir. Bizde bu çalışmamızda sakrifikasyon işlemini 24. saatte yaptığımızdan dolayı TNF- $\alpha$  düzeylerinin başlangıçta yüksekken daha sonra düşmüş olabileceğini düşünmekteyiz.

Ayrıca, Lien Dejager ve ark. (89) yaptığı çalışmada, sıçanlara Polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] ve poly(I:C) + GAL injeksiyonu yapıldığında TNF- $\alpha$  düzeylerinin her iki grupta benzer olduğunu saptamışlardır. Bu veriye dayanarak GAL injeksiyonunun TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine bir etkisinin olmadığını düşünmüşlerdir. Bizde yaptığımız bu çalışmada GAL injeksiyonunun karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkisi olmadığını düşünüyoruz.

Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri, GAL-%10K grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ( $p<0,01$ ). Yine GAL-%20K grubunda, %20K Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptandı ( $p<0,01$ ).

## 6. SONUÇ

1 gr/kg dozunda GAL'ın sıçanlarda tüm gruplarda karaciğerde, biyokimyasal ve histopatolojik olarak hepatosellüler hasara yol açtığı gösterilmiştir. GAL injeksiyonunun tüm gruplarda, LPO'nun son ürünü ve oksidatif stresin iyi bir göstergesi olan MDA seviyesini yükselttiği saptandı. Kefirin GAL hepatitindeki MDA yükselmesini önlediği ve bu etkinin %20'lik derişimde daha belirgin olduğu gösterildi. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, GAL ile oluşturulan hepatit modelinde, daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan özelliği bildirilen kefirin koruyucu etkisinin olmadığı gözlemlendi.

## 7. ÖZET

**AMAÇ:** Bu çalışmada, sıçanlarda D-galaktozamin (GAL) ile oluşturulan akut karaciğer yetmezliğinde kefirin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**MATERYAL VE METOD:** Çalışmaya, 42 erkek Wistar-albino sıçan alınarak, 3 grup 6'şarlı, 3 grupta 8'erli olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Ratlara 1 hafta boyunca normal çeşme suyu, %10'luk ve %20'lik kefir ön tedavisi verilmiştir. 7. gün GAL 1gr/kg dozunda i.p. olarak verildikten 24 saat sonra ratların yaşamlarına son verilerek laparotomi yapılmış ve karaciğerleri çıkarılmıştır. Karaciğer dokusu histolojik olarak değerlendirilmiş, doku düzeyinde malondialdehit (MDA) konsantrasyonu, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), myeloperoksidaz (MPO) enzim düzeyleri ile glutatyon, TNF- $\alpha$  ve IL-10 aktiviteleri ölçülmüştür. Ayrıca serumda AST, ALT, ALP, PT ve INR değerlerine bakılmıştır.

**BULGULAR:** 1gr/kg dozunda i.p. olarak verilen GAL tüm sıçanlarda histolojik ve biyokimyasal olarak akut karaciğer yetmezliğine yol açmıştır. Akut karaciğer yetmezliğinin biyokimyasal parametreleri kefir + GAL gruplarında çeşme suyu + GAL grubuyla kıyaslandığında daha yüksek saptanmıştır. GAL karaciğer dokusunda MDA düzeylerini anlamlı olarak artırırken ( $p<0,001$ ), %20'lik kefir ön tedavisi GAL'ın uyardığı MDA konsantrasyon artışını anlamlı olarak azaltmıştır ( $p<0,001$ ). SOD, CAT ve GSH-Px enzim düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

**SONUÇ:** GAL ile oluşturulan hepatit modelinde, daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan özelliği bildirilen kefirin koruyucu etkisinin olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kefir, Akut Karaciğer Yetmezliği, Oksidatif Stres, D-galaktozamin

## 8. SUMMARY

**AIM:** Investigation of the protective effects of kefir on D-galactosamine (GAL) induced acute hepatic failure.

**MATERIALS AND METHODS:** Forty two male Wistar rats were randomly divided into six groups. Three groups contained six rats and other three groups contained eight rats in each group. Rats were pretreated with tap water, 10% kefir and 20% kefir for seven days. At the seventh day of the study, GAL 1gr/kg was administered i.p. and 24 hours later all animals were sacrificed, laparotomi was performed and liver tissues were taken. Liver tissue samples were histologically evaluated. Malonyldialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) enzyme concentrations were determined. Glutation, TNF- $\alpha$  and IL-10 activities were measured. AST, ALT, ALP, PT and INR levels were also analyzed in serum.

**RESULTS:** Dose of 1gr/kg i.p. GAL caused acute hepatic damage histologically and biochemically in all rats. Biochemical parameters of acute hepatic damage in kefir pretreated groups were higher than in the tap water pretreated group. While GAL increased the levels of MDA significantly ( $p<0,001$ ), pretreatment with %20 kefir significantly decreased the GAL induced MDA concentration ( $p<0,001$ ). SOD, CAT and GSH-Px enzyme levels were not significantly different between groups.

**CONCLUSION:** We showed kefir has no effect on GAL induced hepatitis which has been shown to have antioxidant effects in previous studies.

**Key words:** Kefir, Fulminant Hepatic Failure, Oxidative Stress, D-galactosamine

## 9. KAYNAKLAR

- 1- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 1968; 9: 279–90.
- 2- Sakaguchi S, Yokota K. Role of Ca<sup>2+</sup> on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge: lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice. *Pharmacol. Toxicol.* 1995; 77: 81-6.
- 3- 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; 43: 1151-4.
- 4- Hofmann F, Wagle SR, Decker K. Effect of d-galactosamine administration on nucleotide and protein metabolism in isolated rat Kupffer cells. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1976; 357: 1395-400.
- 5- Keppler DO, Rudigier JF, Bischoff E, Decker KF. The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur. J. Biochem.* 1970; 17: 246-53.
- 6- Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S. Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J.* 2000; 14: 1979-87.
- 7- Nolan JP. Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology.* 1981; 1: 458-65.
- 8- Güven A, Gülmez M. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues, 2003; 50: 412-6.
- 9- Peña JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.* 2003; 5: 277-85.
- 10- O'Grady JO, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342: 273-275.
- 11- Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BII. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *New Engl. J. Med.* 1988; 319: 1557-1562.
- 12- Munoz S.T. Difficult management problems in fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis.* 1993; 13: 395-413.
- 13- Klein AS, Hart J, Brems JJ, Goldstein L, Lewin K, Busuttil RW. Amanita poisoning: Treatment and the role of liver transplantation. *Am J. Med.* 1989; 86: 187-193.
- 14- Sterling RK, Shiftman ML. Fulminant hepatic failure. In Brant LJ. cd: Clinical Practice of Gastroenterology. Philadelphia, *Current Medicine Inc.* 1999; 1010-1018.
- 15- Sugimoto Y, Tarumi T, Kaneko Y, Isayama S, Kawai N. Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 1999; 22: 1237-9.
- 16- Gujral J.S, Farhood A, Jaeschke H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 190: 37-46.
- 17- Fortes Arub C.A, Bortolini R, Arrieira Azambuja A, Alves Filho J.C, Bordignon Nunes F. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by

- galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol. Res.* 2003; 25: 83-91.
- 18- Tran-Thi T.A, Phillips J, Falk H, Decker K. Toxicity of D- galactosamine for rat hepatocytes in monolayer culture, *Exp. Mol. Path.* 1985; 42: 89-116.
- 19- Tsutsui S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki S, Kawamura S, Maeda K, Mikami T. Galactosamine-induced apoptosis in the primary mouse hepatocyte cultures, *Exp. Toxicol. Pathol.* 1997; 49: 301-6.
- 20- Tsutsui S, Itagaki S, Kawamura S, Harada K, Karaki H, Doi K, Yoshikawa Y. D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist, chlorpromazine, and a calcium channel blocker, verapamil, *Exp. Anim.* 2003; 52: 43-52.
- 21- Cheng C.C, Etoh J, Tanimura T, Egashira Y, Ohta T, Sanada H. Effects of dietary gluten on the hepatotoxic action of galactosamine and/or endotoxin in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1996; 60: 439-43.
- 22- Stachlewitz R.F, Seabra V, Bradford B, Bradham C.A, Rusyn I, Germolec D, Thurman R.G. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells, *Hepatology*, 1999; 29: 737-45.
- 23- Stadler J, Bentz B.G, Harbrecht B.G, Di Silvio M, Curran R.D, Billiar T.R, Hoffman R.A, Simmona R.L. Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration, *Ann. Surg.* 1992; 216: 539-46.
- 24- Bradham C.A, Plumpe J, Manns M.P, Brenner D.A, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity TNF-Induced liver injury, *Am. J. Physiol*, 1998; 275: 387-92.
- 25- Guarner F & Schaafsma GJ. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 39:237-8.
- 26- Metchnikoff E. The prolongation of life. *New York & London. Putnams Sons.*
- 27- Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J. Clin. Nutr.* 1974; 27: 464-9.
- 28- Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.* 2000; 78: 80-8.
- 29- Bengmark S. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2003; 5: 833-48.
- 30- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 100: 1171-85.
- 31- Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth ER. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* 2006; 29: 59-68.
- 32- Garrote LG, Abraham GA, Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Jorunal of Dairy Research*, 2001; 68: 639-652.
- 33- Marshall VM, Cole WM. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. 1984; 56: 503-5.
- 34- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J. Dairy Res.* 2005; 72: 195-202.
- 35- Zacconi C, Parisi MG, Sara PG, Dallavelle P, Bottazzi V. Competitive exclusion of salmonella kedougou in kefir fed chicks. *Microbiol. Alim Nutr.* 1995; 12: 387-90.
- 36- Furukawa N, Matsuoka A, Takahashi T, Yamanaka Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 1990; 43: 450-3.
- 37- Furukawa N, Matsuoka A, Takahashi T et al. Anti-metastatic effect of kefir grain components on Lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice. *J. Agric Sci.* Tokyo 2000; 45: 62-70.

- 38- Rodrigues KL, Carvalho JC, Schneedorf JM. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*. 2005; 13: 485-92.
- 39- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D. et al. Immunomodulating capacity of kefir. *J. Dairy Res.* 2005; 72: 195-202.
- 40- Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.
- 41- Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter Disciplinary Approach. *Kluwer Academic Publishers*, 2002.
- 42- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47 : 412 – 426.
- 43- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed). Clarendon Pres, Oxford 1989, 432 – 433.
- 44- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1984; 1: 1396-1397.
- 45- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
- 46- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142: 231-255.
- 47- Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J. R. Soc. Med.* 1989; 82: 747-752.
- 48- Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
- 49- Parks DA. Oxygen radicals: mediator of gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1989; 30: 293-298.
- 50- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1995; 5: 21-29.
- 51- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull* 1993; 49: 481-493.
- 52- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. 2007; 115: 81-103.
- 53- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları*, Konya. 1995; 1-132.
- 54- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1-15.
- 55- Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D. 1994
- 56- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta.* 2006; 365: 30-49.
- 57- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 1993; 90: 7915-7922.
- 58- Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2006; 42: 289-306.
- 59- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 112-119.

- 60- Ayçiçek A, Erel O, Koçyiğit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur. J. Pediatr.* 2005; 164: 775-778.
- 61- 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.
- 62- Fedeli D, Falcioni G, Olek RA, Massi M, Cifani C, Polidori C, Gabbianelli R. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J. Appl. Toxicol.* 2007.
- 63- Wright CE, Tallan HH, Lin YY. Taurine, biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55: 427-453.
- 64- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
- 65- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer RF, Limson J, Weintraub ST, Qi WB. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29: 1177-85.
- 66- Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto.* 1974; 73: 1075-1086.
- 67- Dat J, Vandenberghe S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 57: 779-795.
- 68- Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksid dismutaz. *Biyokimya Dergisi.* 1986; 3: 59-76.
- 69- Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa J. Med.* 1996; 27: 41-50.
- 70- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 266: 37-56.
- 71- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- 72- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.
- 73- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 1988; 34: 497-500.
- 74- Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis.* New York and London: *Academic Press*, 1974; 673-677.
- 75- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-169.
- 76- K. Ishak, A. Baptista, L. Bianchi. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 1995; 22; 696-9
- 77- R. Ferencikova, Z. Cervinkova, Z. Drahotova. Hepatotoxic Effect of D-Galactosamine and Protective Role of Lipid Emulsion. *Physiol. Res.* 2003; 52: 73-78.
- 78- De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology.* 1992; 15: 1147-53.
- 79- Bekesi JG, Bekesi E, Winzler RJ. Inhibitory effect of D-glucosamine and other sugars on the biosynthesis of protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid in normal and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* 1969; 25: 3766-72.



- 80- 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.
- 81- Mourelle M, Meza MA. Colchicine prevents D-galactosamine induced hepatitis. *J. Hepatol.* 1989; 8: 165–72.
- 82- Sakaguchi S, Yokota K. Role of Ca<sup>2+</sup> on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge: lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice. *Pharmacol. Toxicol.* 1995; 77: 81–6.
- 83- Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004; 24: 469–473.
- 84- Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, Veech RL. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1990; 14: 255–9.
- 85- Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, et al. Apoptotic cell death in the response of Dgalactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect. Immun.* 1996; 64: 734–738.
- 86- Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216: 167–187.
- 87- Brucoleri A, Gallucci R, Germolec DR, Blackshear P, Simeonova P, Thurman RG, et al. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology.* 1997; 25: 133–141.
- 88- Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, et al. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with Dgalactosamine/ lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology.* 2001; 33: 1441–1450.
- 89- 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