

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**SIÇANLARDA TIYOASETAMİD İLE UYARILAN AKUT KARACİĞER
YETMEZLİĞİNİ ÖNLEMEDE KEFİRİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. KASIM DEMİR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. YILDIRAN SONGÜR

ISPARTA-2008

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**SIÇANLARDA TİYOASETAMİD İLE UYARILAN AKUT KARACİĞER
YETMEZLİĞİNİ ÖNLEMEDE KEFİRİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kasım DEMİR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1359-TU-06 proje numarası ile deteklenmiştir.

ISPARTA-2008

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet İŞLER, Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç.Dr. H. Şenol COŞKUN, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU, Uzm. Dr. İbrahim GÖREN, Uzm. Dr. Murat DEMİR'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin VURAL ve Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Metin ÇİRİŞ'e, laboratuvar çalışmamda emeği geçen başta Dr. Erkan CÜRE., Dr. Abdülkadir BAŞTÜRK, Dr. Yunus UGAN, Ali Rıza BAYKAL, Dr. M. CUMHUR CÜRE ve tez yazılmasında bana yardımcı olan değerli arkadaşım Dr. Ozan YILMAZ olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşime en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Kasım DEMİR

KISALTMALAR

AKY	Akut Karaciğer Yetmezliği
HE	Hepatik ensefalopti
NSAİİ.	Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar
SOR.	Serbest oksijen radikalleri
TAA	Tiyoasetamid
TNF-α	Tumör Nekrozis Faktör Alfa
NAD.	Nikotinamid adenin dinükleotid
MPO.	Myeloperoksidaz
MDA.	Malondialdehit
SOD.	Süperoksit dismutaz
CAT.	Katalaz
GPX.	Glutasyon peroksidaz
GSSG.	Okside glutasyon
GSH.	Redükte glutasyon
PUFA.	Poliansatüre yağ asitleri
NOS.	Nitrik oksit sentaz
iNOS	Inducible Nitrik Oksit Sentetaz
NF-κB.	Nüklear Faktör Kappa-B
OH.	Hidroksil
O₂⁻.	Süperoksit anyonu
H₂O₂.	Hidrojen peroksit
NO.	Nitrik oksit
HOCl.	Hidroklorik asit
LOOH.	Lipid hidroperoksit
LOO[•].	Peroksil radikalleri
ATP.	Adenozin trifosfat
i.p.	İntraperitoneal
SF.	Serum fizyolojik

İÇİNDEKİLER

No	Başlık	Sayfa No
	TEŞEKKÜR	i
	KISALTMALAR	ii
	İÇİNDEKİLER	iii
1.	GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	1
2.1.	Tez çalışmasının hipotezleri	1
2.2.	Akut karaciğer yetmezliğinde probiyotik tedavi	3
2.3.	Probiyotikler	4
2.4.	Kefir	6
2.5.	Akut karaciğer yetmezliği (AKY)	8
2.5.1.	AKY'de klinik özellikler	9
2.5.2.	İlaça bağlı karaciğer hastalığı	13
2.5.2.1.	İlaç metabolizmasında karaciğer	14
2.5.2.2.	İlaç hepatotoksisitesinde patogenezi	16
2.6.	Thioacetamide bağlı hepatotoksisite	20
2.7.	Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres	21
2.7.1.	Serbest oksijen radikal kaynakları	22
2.7.2.	Serbest oksijen radikal türleri	23
2.7.3.	Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri	24
2.8.	Antioksidan Sistemler	25
2.8.1.	Enzimatik Antioksidanlar	25
2.9.	Hepatotoksisite ve sitokinler	27
3.	MATERYAL ve METOD	29
3.1.	Materyal	29
3.1.1.	Deney Hayvanları	29
3.1.2.	Kefirin hazırlanması	29
3.1.3.	Kullanılan malzeme ve aletler	30
3.2.	Metod	30
3.2.1.	Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	30
3.2.2.	Doku ve örneklerin çıkarılması	34
3.2.3.	Biyokimyasal analiz yöntemleri	34

3.2.4.	Karaciğerin çıkarılması	35
3.2.5.	Histopatolojik Analiz Yöntemleri	35
3.3.	İstatistiksel Analiz	36
4.	BULGULAR	37
4.1.	Sıçanların gruplara göre tükettikleri günlük çeşme suyu, kefir ve yem miktarları	37
4.2.	Sıçanlardaki ağırlık değişiklikleri	38
4.3.	Sıçanlardaki karaciğer ağırlık değişiklikleri	38
4.4.	Karaciğer fonksiyon testleri	39
4.5.	Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri	41
4.6.	Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri	42
4.7.	Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri	43
4.8.	Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri	44
4.9.	Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri	45
4.10.	Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri	46
4.11.	Grupların histopatolojik değerlendirilmesi	47
5.	TARTIŞMA	48
6.	SONUÇ	52
7.	ÖZET	54
8.	İNGİLİZCE ÖZET	55
9.	KAYNAKLAR	56

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fulminan karaciğer yetmezliği, akut hepatitin ciddi bir komplikasyonudur. Masif karaciğer hücre nekrozu ve ansefalopati ile karakterizedir ve yüksek mortalite oranı ile birlikte. Fulminan karaciğer yetmezliğinde etkinliği kanıtlanmış tek tedavi yöntemi acil karaciğer transplantasyonudur. Bugüne kadar akut karaciğer yetmezliğinin tedavisinde deneysel olarak, antioksidan, Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B) ve Inducible Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) aktivasyonunu inhibe eden, anti-inflamatuvar ve serum endotoksin düzeyini azaltmayı amaçlayan pekçok ilaç denenmiştir. Fakat medikal tedavilerin etkinliği sınırlıdır ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Kronik hepatik ansefalopatide probiyotiklerin terapötik katkısı gösterilmiştir (1). Ancak akut karaciğer yetmezliğinde probiyotikler denenmemiştir. Sıçanlarda düşük doz tiyoasetamid (TAA) enjeksiyonu ile oluşturulan minimal hepatik ensefalopatide probiyotik bakteriler yararlı bulunmuştur (2). Kefir TAA hepatitinde daha önce kullanılmamıştır.

Bu çalışmada TAA'ya bağlı akut karaciğer yetmezliğinde kefirin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tez çalışmasının hipotezleri

Fulminan karaciğer yetmezliği, akut hepatitin ciddi bir komplikasyonudur. Masif karaciğer hücre nekrozu ve ansefalopati ile karakterizedir ve yüksek mortalite oranı ile birlikte. Fulminan karaciğer yetmezliğinde etkinliği kanıtlanmış tek tedavi yöntemi acil karaciğer transplantasyonudur.

İlaç hepatotoksitesisi ve viral hepatit gibi çeşitli etyolojilerle meydana gelen akut karaciğer yetmezliğinin patogeneğinde reaktif oksijen radikallerinin artması, glutatyon depleasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin artması, nitrik oksit ve NF- κ B'nin aktivasyonu suçlanmıştır (3, 4, 5).

Thioacetamide (TAA), deneysel hepatotoksin olarak sıklıkla kullanılmaktadır; verilme süresi ve doza bağlı olarak hepatik nekroz veya siroza neden olmaktadır. TAA'in hepatik lezyon yapıcı başlıca mekanizmalarından biri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve doku antioksidan düzeylerinin değişerek oksidatif stresin artmasıdır (6, 7, 8). TAA'e bağlı fulminan karaciğer yetmezliğinde, hidroksil radikal

temizleyici dimetilsülfoksit ve dimetiltiyöüre'nin (7) güçlü bir serbest radikal temizleyici olan melatonin'in (9), bir antioksidan olan curcumin'in (10) sürviyi iyileştirirken, oksidatif stresi, hepatoselüler yıkımı ve hepatik nekroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir.

Ayrıca, curcumin'in, NF- κ B bağlanmasını ve iNOS ekspresyonunu azalttığı da saptanarak, sıçan TAA-karaciğer yetmezliği modelinde, reaktif oksijen radikalleri yanı sıra, NF- κ B ve iNOS'un karaciğer yıkımında aracı olduğu ileri sürülmüştür (10). Başka bir sıçan fulminan karaciğer yetmezliği modelinde ise, bir antioksidan ve NF- κ B aktivasyon inhibitörü olan pirolidin ditiyokarbamat'ın (PDTC) karaciğer haraplanmasını azalttığı ve sürviyi iyileştirdiği gösterilmiştir (8).

Vazodilatasyon ve kapiller permeabilitenin artması hepatik ansefalopatinin akut ve kronik formlarının patogeneğinde suçlanmıştır. Prostaglandin (PGI₂) ve nitric oksit (NO), portal hipertansiyonda hiperdinamik dolaşıma katkıda bulunan önemli medyatörlerdir (11). Nitrik oksit, inflamasyonun başlıca mediyatörlerinden biridir. Nitrik oksidin akut karaciğer yetmezliğindeki rolüne ilişkin bilgiler ise çelişkilidir.

Erkek Sprague-Dawley sıçanlarında 24 saat ara ile 3 kez intraperitoneal TAA (350 mg/kg/gün) enjeksiyonu ile oluşturulan akut karaciğer yetmezliğinde L-N-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) tedavisi yapılan grupta mortalite oranı daha yüksek bulunmuş (59% vs. 18%, P < 0.01) ve TAA ile uyarılan akut karaciğer yetmezliğinde NO'in protektif rolünün olduğu ileri sürülmüştür (12).

Yine TAA ile sıçanlarda oluşturulan fulminan karaciğer yetmezliğinde, nitrik oksit formasyonunun inhibisyonunun karaciğer lezyonunu ağırlaştırdığı, sıçanların sürvisini azalttığı saptanmıştır (7). TAA-akut karaciğer yetmezliğinde iNOS inhibitörü aminoguanidin'in, karaciğer hasarının şiddetini azalttığı ve sürviyi iyileştirdiği bildirilmiştir (13).

Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF-alfa'nın, akut fulminan hepatitte hücre yıkımında rol aldığı düşünülmektedir (14, 15). Sıçanlarda TAA ile uyarılan fulminan karaciğer yetmezliğinde endotoksin ve TNF-alfa'nın, hepatik ansefalopatinin patogeneğine katıldıkları gösterilmiştir. Sıçanlarda 3 kez, 350 mg TAA ile uyarılan fulminan karaciğer yetmezliğinde yüksek endotoksin ve TNF-alfa düzeyleri ile ensefalopati şiddeti arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Endotoksin ve TNF-alfa konsantrasyonları arasında da doğrusal ilişki bulunmuştur (16).

2.2. Akut karaciğer yetmezliğinde probiyotik tedavi

Bugüne kadar klinik akut karaciğer yetmezliğinde herhangi bir probiyotik tedavi deneyimi sonucu bildirilmemiştir. Kronik karaciğer hastalığına bağlı hepatik ansefalopati vakalarında yapılan iki çalışma bulunmaktadır (1). Hepatik ansefalopatinin kesin patogenezi hala tam olarak bilinmemekle birlikte, barsak florası metabolizma ürünlerinin rolü yaygın olarak kabul edilmektedir. Bugün, sindirim kanalındaki mikroflora konsantrasyonunu düşürmek ve hepatik ansefalopati patogenezinde yer alan mediatörleri azaltmak amacıyla genellikle oral antibiyotikler kullanılmaktadır. Probiotikler hepatik ansefalopati patogenezinin kırabilecek çeşitli etki mekanizmalarına sahiptirler ve geleneksel tedaviye üstün olabilirler.

Bir klinik çalışmada 55 kronik hepatik ansefalopatili karaciğer sirozu hastasına 4 hafta süreyle standard tedavi ve *Enterococcus faecium* M-74 ile birlikte selenyum verildiğinde, portal sistemik ansefalopati indeksinin anlamlı olarak düzeldiği, asterikslerin kaybolduğu, kan amonyak düzeyleri ve sayı tamamlama testinin 8-9 haftada normal paterne döndüğü gözlenmiştir (17). Bir başka çalışmada, minimal hepatik ansefalopatili hastalarda sinbiyotik tedavisi (probiyotik bakterilerin ve prebiyotik maddelerin birlikte verilmesi) feçesi, *Lactobacillus* türlerinden zenginleştirirken, hastaların %50'sinde kan amonyak düzeyini normalleştirdiği, endotoksemide anlamlı azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (18).

TAA ile oluşturulan bir deneysel akut karaciğer yetmezliği modelinde probiyotik preparatı 'Golden Bifid', minimal hepatic ansefalopatinin tedavisinde laktüloz kadar etkin bulunmuştur (2).

Probiyotikler, TAA ile uyarılan akut karaciğer yetmezliğinde çeşitli mekanizmalarla önleyici / terapötik yarar sağlayabilirler:

- Kefirin antioksidan özelliği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (19, 20). Farelerde oluşturulan karbon tetraklorür toksisitesinde kefirin antioksidan parametreleri olumlu yönde etkilediği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (21).
- Probiyotikler, innate ve adaptif immün yanıtı modüle ederler. Probiyotik bakteriler *Escherichia coli* ve laktobasillerin monosit popülasyonlarını ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu süprese ettiği ve antiinflamatuvar IL-10 yapımını artırdığı gösterilmiştir (22).

- Lactobacillus rhamnosus GG'nin, "lipopolisakkarid-stimulated macrophage" TNF-alfa yapımını inhibe ettiği saptanmıştır (23).
- Yeni bir çalışmada kefirin, farelerde Th2 yanıtını daha güçlü olarak uyardığı ve Th1 yanıtının kontrol edildiği bildirilmiştir (24).
- Probiyotik bakterilerin ve DNA'larının, TNF-alfa'ya yanıtta, nükleer transkripsiyon-κB yolağını inhibe ettiği gözlenmiştir (25).
- Komensal anaerobik barsak bakterilerinin, "peroxisome proliferator activated receptor-gamma"nın aktivasyonu yoluyla NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (26).
- Probiyotiklerin, TNF'nin uyardığı proapoptotik p38/mitogen-activated protein kinase'ın aktivasyonunu azaltmak suretiyle sitokinlerin uyardığı apoptozu inhibe ettikleri de bulunmuştur (27).
- Bir probiyotik bakteri olan Lactobacillus rhamnosus ile ön tedavi yapılan deney hayvanlarında, hemorrajik şok sonrası gelişen plazma endotoksin düzeyi artışının anlamlı olarak daha az olduğu bildirilmiştir (28).
- Sinbiyotik tedavinin sıçanlarda oluşturulan akut pankreatitin neden olduğu endotokseminin tedavisinde yararlı olduğu saptanmıştır (29).
- Probiotikler, anaerobik bakterileri artırarak ve potansiyel olarak patojen olan mikroorganizmaların sayısını azaltarak barsak mikroflorasını modüle ederler; luminal endotoksin miktarını azaltırlar ve endotoksin translokasyonu ve endotoksemi ihtimalini düşürürler (30).
- Öte yandan probiyotikler nitrik oksit yapımını uyararak da karaciğer yetmezliğini tedavi etmede katkıda bulunabilirler. Lactobacillus salivarius ssp. salivarius'un (31) ve L. farciminis'in (32) deneysel trinitrobenzen sulfonik asit kolitinde nitrik oksit yapımını uyararak iyileşmeye katkıda buldukları bildirilmiştir.

2.3. Probiyotikler

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında mikrobiyologlar sağlıklı bireylerin gastrointestinal sistem florasında hastalıklı bireylerden farklı bir mikroflora tanımlamışlardır. Gastrointestinal sistemde bulunan bu yararlı mikroflora probiyotik olarak adlandırılmıştır. Probiyotik kelime anlamı olarak "for life" "yaşam için" manasına gelmektedir (33).

İlk olarak 1908 yılında Nobel ödülünü de kazanan Elie Metchnikoff, Bulgar köylülerinin uzun yaşamasının nedeninin bu insanların fazla miktarda fermente süt ürünlerini tüketmeleri ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (34). Metchnikoff, intestinal flora bakterilerinin protein hidrolizi sonucu oluşturduğu amonyak, aminler ve indol gibi maddelerin konakta intoksikasyona neden olduğunu ve enerjisini protein hidrolizi yerine karbonhidrat fermantasyonundan sağlayan laktik asit bakterilerinin kullanımının faydalı sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Özellikle son iki dekatta probiyotikler oldukça popüler olmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda probiyotik kullanımının insan sağlığına olumlu etkileri olduğu, beslenme ve tedavi amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir (35, 36). Daha sonra ise çeşitli mikroorganizma içeren probiyotikler hastalıklardan korunma veya kür sağlama amacıyla kullanılmıştır.

1974 yılında Mann ve Spoering yaptıkları çalışmada (37) *Lactobasillus sp.* ile fermente edilmiş yoğurt tüketen kişilerin serum kolesterol düzeyinin daha düşük olduğunu göstermesi, probiyotiklerin etkilerini araştıran çalışmaların önünü açmıştır. Bu çalışma ile probiyotiklerin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri olduğunun bildirilmesinden sonra özellikle son iki dekatta probiyotikler üzerine klinik çalışmalar yapılmıştır. 1994 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü probiyotiklerin bağışıklık sistemine yaptığı olumlu etkiyi resmen bildirmiştir (38). Probiyotik kullanımı ile gözlenen bu olumlu etkilerin içerdikleri laktik asit bakterilerine bağlı olduğu bildirilmiştir (39).

Halen günümüzde probiyotik preparatları toz, tablet, kapsül, granül ve pelet şeklinde kullanılabilir. Tablo 1’de probiyotik preparatlarında kullanılan başlıca laktik asit bakterileri gösterilmiştir (40).

Tablo 1. Probiyotik hazırlamada sıklıkla kullanılan bakteri türleri			
Lactobacillus sp.	Bifidobacterium sp.	Enterococcus sp.	Streptococcus sp.
<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>			

2.4. Kefir

Kefir asidik ve hafif alkolik, krema kıvamında, hafif ekşimsi tadı olan fermente bir süt ürünüdür; eşit olarak dağılmış mikrofloranın metabolik aktivitesi ile değil, ayrı ayrı ‘kefir taneleri’ nin matriksinde bulunan miks mikroflora ile fermentasyon sonucunda meydana gelir (41).

Kefir kelimesinin ‘‘keyif veren, coşturan, mest eden’’ manalarını taşıyan ‘‘keyf’’ kelimesinden türemiş olabileceği sanılmaktadır. Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran özelliği, kefir taneleri denen (grains) özelleşmiş ve biyolojik olarak canlı organizmalar olarak davranan yapılardan üretilir. Kefir taneleri 8-10 mm çapında karnabahara benzeyen jelatinöz ve düzensiz partiküllerdir (Şekil 1). Bu taneler büyür, çoğalır ve özelliklerini bir sonraki jenerasyona aktarırlar. Kefir tanelerinin mikroflorası oldukça stabildir. Eğer uygun kültürel ve fizyolojik koşullarda saklanırsa yıllarca aktivitelerini koruyabilirler. Günümüzde doğal kefir taneleri kullanılarak kefir yapılabildiği gibi, starter kültürler kullanılarak yapılan endüstriyel kefirler de piyasada mevcuttur (42).

Kefirde alkol ve laktik asit fermentasyonu birlikte gerçekleşmektedir. Kefirde bulunan maya ve laktik asit bakterilerinin metabolik aktiviteleri sonucu süt asidi, etil alkol ve karbondioksit oluşur (43).

Kefir taneleri kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Kefir mikroflorasında, tanenin aslına bağlı olarak laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile

homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri bulunur. Bu flora, laktozun mikrobiyal metabolizması sonucu oluşan glukoz ve galaktoz zincirlerini içeren kefiran adındaki polisakkarit yapı (kefir tanesi) içerisinde simbiyotik yaşam sürer.

Kefir tanesinde en sıklıkla, homofermentatif ve heterofermentatif laktobasiller, laktokoklar, leukonostoklar, asetik asit bakterileri ve mayalar simbiyotik olarak yaşam sürer. (44).

Bu flora ek olarak kefirin vizkozitesini ve kıvamını artıran *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter rasens*'in önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (45, 46). Orijinine bağlı olmak üzere kefir tanesindeki yerleşik mikroorganizmaların sayısı, cinsi ve türü değişebilir.



Şekil 1. Kefir taneleri

Kefirde bulunan mikroorganizmaların temel fonksiyonu, laktik asit, antibiyotik ve antibakterisit üretimidir. Daha önce yapılan çalışmalarda kefirin

hayvanlarda antibakteriyel, immunolojik ve anti-tümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir (47, 48)

Kefir danelerini yapan mikroorganizmaların, laktik asit, antibiyotik ve bakterisid ürettiği bildirilmiştir (49).

Ayrıca kefirin çok tüketildiği bölgelerde tüberküloz ve sindirim bozukluğu gibi hastalıkların daha az görüldüğü bildirilmiştir. Bunlarla birlikte kefirin hayvanlarda antitümör, immunstimulan etkileri ve lipit peroksidasyonunu azaltan anti-oksidan aktivitesi, antidiyabetik, antibakteriyel ve antifungal etkilerinin olduğu bildirilmiştir (50).

Çoğu laktik asit bakterlerinin oksijen radikallerini metabolize eden sistemleri vardır. Stecchini ve arkadaşları 2000 de bu anti-oksidan sistemin en önemlisinin superoksit dismutaz (SOD) ve yüksek magnezyum +2 içeriği olduğunu bildirmiştir. (51).

Knauf ve ark. 1992 de bazı laktobasili türlerinin yüksek oranda heme bağımlı katalaz sentezlediği ve serbest peroksi radikallerinin oluşumunu önlediğini göstermiştir. (52)

Sıçanlarda TAA ile uyarılan akut karaciğer yetmezliğinin önlenmesinde probiyotik ürün olarak kefir'i seçmemizin nedeni, ülkemizde üretilmesi, yaygınlaştırılabilir ve hoş tadı olan bir içecek olmasıdır.

2.5. Akut karaciğer yetmezliği (AKY)

Akut karaciğer yetmezliği (AKY), aniden ortaya çıkan, daha önce bilinen karaciğer hastalığı olmayan ve/veya kompanse karaciğer hastalığı olanlarda, karaciğer hastalığı bulguları (ikter) ve birlikte koagülopati başlamasını takiben ilk 3 ay içerisinde hepatik ensefalopatinin (HE) oluşması ile karakterize klinik tablodur. Ensefalopati, tanının esas elemanıdır. AKY'de semptomlar sıklıkla non-spesifiktir. Halsizlik-yorgunluk, bulantı hissi, abdominal bölgede, sıklıkla sağ üst kadranda huzursuzluk hissi ve bunu takiben aniden ortaya çıkan, progresif seyir gösteren bir sarılıkla birlikte şuur durumunun bozulması görülür. Şuur durumu bozukluğu hafif konfüzyondan ağır komaya kadar değişkenlik gösterebilir (53).

Birçok vakada, AKY ilaca bağlı ya da viral hepatit gibi şiddetli, hızlı ilerleyici seyri olan akut bir karaciğer hastalığı şeklinde ortaya çıkar. Az sayıda vakada AKY Wilson Hastalığı, otoimmün hepatit ya da kronik hepatit B'nin

reaktivasyonu gibi altta yatan kronik karaciğer hastalığının ilk bulgusu olabilir. AKY'ne sıklıkla multiorgan yetmezlik tablosu eşlik eder ve destekleyici tedavi ile mortalite oranı % 50-90 arasında değişir. (54).

Etiyoloji:

AKY'nin nedenleri çok çeşitlidir. Ancak ilaçlara ve viral hepatitlere bağlı gelişen AKY, belirlenebilir tüm nedenlerin % 80-85'ini oluşturur (55).

AKY'nin bilinen nedenleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

2.5.1. AKY'de klinik özellikler

AKY'li hasta tam veya tama yakın hepatektomi yapılmış birisi gibidir. Masif veya submasif hepatoselüler nekroza bağlı parankim kaybının sebep olduğu karaciğer yetersizliği ana patolojidir. Portal-sistemik şantlar yoktur, ancak fonksiyonsuz karaciğerin kendisi portal ve sistemik dolaşım arasında bir şant gibidir. Klinik tabloyu akut karaciğer hasarına yol açan hastalık ile birlikte hepatik ensefalopati (HE)'nin nöropsikiyatrik belirti ve bulguları oluşturur.

Tablo 2. Akut karaciğer yetmezliği nedenleri.

- Viral Hepatitler
Hepatit A, B, C, D ve E Virüsleri
- Diğer virüslere bağlı hepatit
HSV 1,2 ve 6, EBV, CMV, Adenovirus
- İlaçlara bağlı
Asetaminofen, İzoniazid, Amiodaron, NSAİİ, CCl₄
İdiyosenkratik ilaç reaksiyonu
- Toksik nedenler
Mantar (Amanita phalloides), Organik bileşikler, fosfor
- Metabolik bozukluklar:
Gebeliğin akut yağlı karaciğeri, Reye sendromu
- Vasküler olaylar
Akut dolaşım yetmezliği, Budd-Chiari sendromu, Venookluzif hastalık, sinuzoidal obstrüksiyon sendromu, hepatik arter trombozu, portal ven trombozu
- Diğer nedenler
Wilson Hastalığı, otoimmün hepatit, masif tümör infiltrasyonu, karaciğer transplantasyonu sonrası primer graft fonksiyon bozukluğu

AKY tanısı için HE olması şarttır. Bunu için öncelikle HE tanısının konması gerekir. HE'nin klinik evreleri tablo'3 de gösterilmiştir (56).

Kişilik ve davranış değişikliği, kişilik bozuklukları, (uygunsuz konuşma ve davranışlar, depresif ve öforik davranışlar), konuşma bozuklukları (yavaş konuşma, dizartri), uyku ritminde bozukluklar (uyuyamama, çok uyuma), mental fonksiyonlarda bozulma ve konfüzyon gözlenebilir. AKY'de klinik tablo hızlı seyir gösterdiği için bu belirtilerin bir kısmı fark edilmeden hastada koma tablosu gelişebilir. Bununla birlikte AKY'li hastalarda "flapping tremor", derin tendon reflekslerinde artma, babinski ve klonus gibi patolojik refleksler ortaya çıkabilir. Myokloniler, rijidite, delirium ve konvülsiyonlar gibi AKY'ye spesifik olmayan nörolojik belirtiler de gözlenebilir. Koma belirtilerinin görüldüğü evrede hemen daima beyin ödemi ve kafa içi basınç artımı söz konusudur.

Ağır AKY'de mevcut tabloya ilave olarak kardiovasküler, respiratuvar, renal, infeksiyon ve metabolik bozukluklarında eklenmesi ile multiorgan yetersizlik tablosu gelişebilir. (53)

Hepatik ensefalopati ve beyin ödemi: HE ve beyin ödemi, her ikisi de mental durumu değişmesi gibi benzer klinik tablo oluşturan nedenler olmasına rağmen her iki tabloda patogeneze farklıdır. Amonyak ve endojen benzodazepin agonistlerinin santral sinir sisteminde birikmesi sonucu HE tablosunun oluştuğu ileri sürülmektedir. HE tablosu sıklıkla geri dönüşümlüdür, ancak fatal seyirli olabilir. Sitokin salınımı, hipoksi ve nitrik oksid salınımına bağlı oluşan, lokal ve sistemik ilişkili serebral vazodilatasyon, serebral ödem gelişimi patogenezinde rol alan en önemli faktör olduğu ileri sürülmektedir. Serebral ödem "uncal" herniasyona sebep olursa tablo sıklıkla fatal seyirlidir.

Normal kafa içi basıncı 12 mm Hg'nın altındadır, bu basınç 25-30 mm Hg'nın üzerine çıkınca beyin ödeminin klinik belirtileri başlar. Beyin ödemi ve herniasyon geliştiği geç döneme kadar pupil ve beyin sapı refleksleri normaldir. Hiperventilasyon, hipertonsite, pupilla reflekslerinin kaybı, dilate pupiller, deserebrasyon postürü ve beyin sapı reflekslerinin kaybı (kornea refleksi) herniasyon ve ölüme kadar giden süreçteki nörolojik bulgulardır. Okülo-vestibüler refleksin kaybı irreversibl beyin sapı hasarını gösterir.

Tablo 3. Hepatik ensefalopatinin klinik evreleri.		
Evre	Mental Durum	Nörolojik Bulgular
Evre 1	Öfori, depresyon, psikomotor aktivitede yavaşlama, uyku bozuklukları, konuşma bozuklukları, yer, zaman, kişi oryantasyon bozukluğu	Hafif asteriksis Normal EEG
Evre 2	Evre 1 belirtilerinde belirginleşme, uygunsuz davranışlar, sfinkter kontrolünde bozulma	Asteriksis, ataksi, hiperaktif refleksler, patolojik reflekslerin (Babinski, Klonus) ortaya çıkması, EEG’de yavaş ritim oluşması
Evre 3	Devamlı uyku hali ancak uyandırılabilir, belirgin konfüzyon, amnezi, letarji	Evre 2 bulgularına ek olarak, nistagmus, rijidite, EEG’de yavaş ritim ve trifazik dalgalar
Evre 4	Derin uyku hali, ağrılı uyarılara yanıtta azalma – yanıtızlık, derin koma hali	Normal reflekslerin kaybı, rijidite, deserebrasyon postürü, Papilla reflekslerinin kaybı (dilate papilla), beyin sapı reflekslerinin ortaya çıkması EEG’de delta dalgalarının oluşması

Koagülopati: AKY’de bir çok koagülasyon bozuklukları görülebilmektedir. Faktör II, V, VII, IX ve X sentez yetersizliği nedeniyle protrombin ve parsiyel tromboplastin zamanında uzama görülür. Hastanın klinik durumunu ve prognozunu değerlendirmede en önemli yaklaşım faktör V düzey ölçümü ve takibidir. Bu nedenle AKY’li hastalarda taze donmuş plazma replasmanı, karaciğer hasar derecesinin takibini etkilememesi, transplantasyon zamanının iyi yapılabilmesi amacıyla sadece kanama ve invaziv girişimler sırasında verilmesi önerilir. Bu hastalarda koagülopati nedeniyle gastrointestinal sistem kanamaları, venöz veya arteriyel giriş yeri kanamaları oluşabilir.

AKY'li hastalarda trombositopeni de sık rastlanan bulgudur. Trombositopeni kemik iliği supresyonu ve DIC tablosuna bağlıdır. Kanaması olan hastalara, eğer trombosit düzeyi $50.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ altında ise trombosit infüzyonu yapılmalıdır.

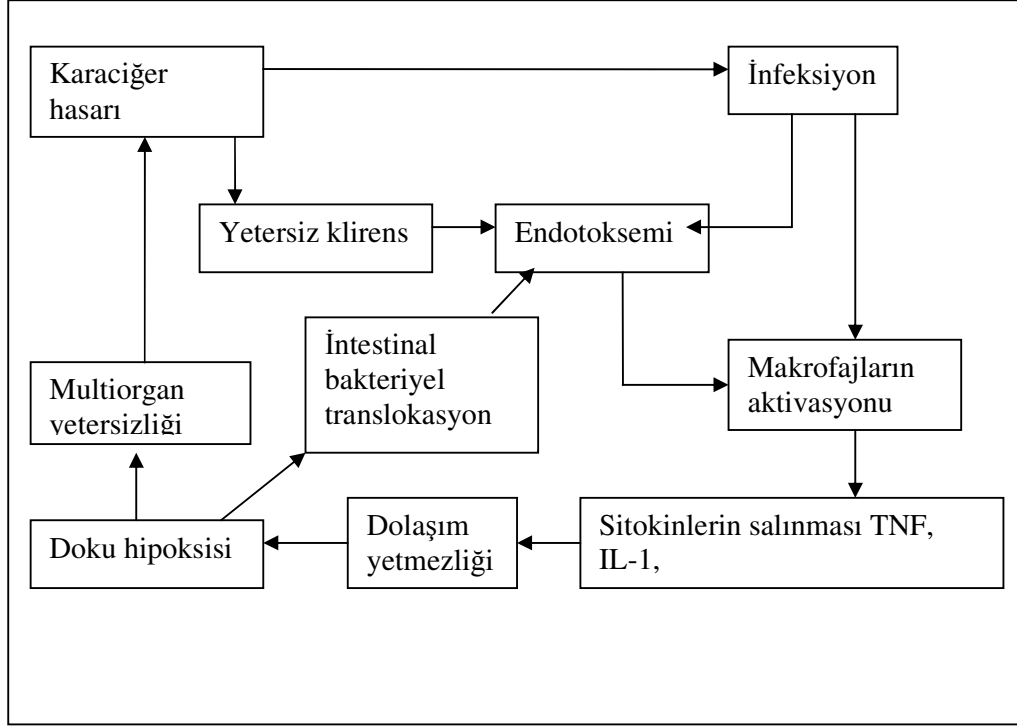
Renal yetmezlik: AKY'li hastaların yaklaşık %50'sinde renal yetmezlik gözlenir. Prognozu negatif yönde etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu hastalarda renal yetmezlik; fonksiyonel (hepatorenal sendrom), prerenal (hipovolemi, hipotansiyon, dehidratasyon) ve akut tübüler nekroza (ilaca bağlı nefrotoksisite) bağlı gelişebilir. AKY'li hastalarda renal yetmezliğe bağlı olarak hiponatremi, hipofosfatemi, hipokalsemi, hipomagnezemi gibi elektrolit bozuklukları gelişebilir. Ağır metabolik asidoz, hiperkalemi ve volüm fazlalığında hemodiyaliz ve/veya arteriovenöz hemofiltrasyon gerekebilir.

Kardiovasküler ve Respiratuvar sistem bozukluklar: Kardiak atım volümünde artma, sistemik vasküler dirençte azalma AKY'li hastalarda sıklıkla rastlanan kardiovasküler bozukluklardır. Hipotansiyon, doku beslenmesini bozarak karaciğer yetmezliğini alevlendirir. Yeterli volüm replasmanı, vazoaaktif ilaçların (dopamin infüzyonu) uygulaması kan basıncı ve doku perfüzyonu için gereklidir.

AKY'li hastalarda respiratuvar sistemde hafif X-ray görüntüleme bozukluklarından, dispne, hipoksi, metabolik asidoz, pnömoni, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve adult respiratuvar distres sendromuna kadar değişkenlik gösteren klinik tablolar gözlenebilir.

Enfeksiyon: AKY'li hastalar bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar için risk altındadırlar. Parenteral uygulamalar, yoğun bakım ortamı, idrar sondası, entübasyon gibi girişimler enfeksiyon kazanılmasını kolaylaştırıcı işlemlerdir. Bazı ünitelerde AKY'li hastalarda enfeksiyon sıklığı %80 civarındadır. En sık olarak pulmoner enfeksiyon (%50), idrar yolları enfeksiyonu (%22) ve bakteriyemi (%6) görülür. Enfeksiyonların %50'sinden gram pozitif bakteriler (Staphylococcus aureus, koagülaz negatif stafilokoklar) sorumludur. Bunu gram negatif enterik bakteriler izler. Hastaların 1/3'ünde fungal enfeksiyonlar (özellikle Candida) görülür. Sepsis %20 hastada gözlenir ve transplantasyon için kontrendikasyon oluşturmaktadır. Bakterilerden ortama salınan endotoksemi, buna karşı aktive olan sitokin salınımı, ortaya çıkacak septik şok, doku hipoksisi ve multiorgan yetmezliğinin en önemli nedenidir. (57, 53)

AKY'de oluşan multiorgan yetersizliğinin patogenezi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. AKY'de oluşan multiorgan yetersizliğinin patogenezi (Kaynak 56'dan alınmıştır.)

2.5.2. İlaça bağlı karaciğer hastalığı

Kullanılan yüzlerce ilaçlar ve/veya toksik maddelere bağlı olarak meydana gelen ve değişik oranlarda hepatoselüler hasar ve/veya kolestaz bulguların söz konusu olduğu kliniko-patolojik durum olarak tanımlanabilir. Klinik tablo belirtisiz enzim yüksekliklerinden akut karaciğer yetmezliğine kadar değişiklik gösterebilir. Ayrıca kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatobiliyer tümörler gelişebilir.

İlaça bağlı karaciğer hasarı ortalama 1-10/100.000 oranında gözlenir. Karaciğerde meydana gelen hasarın derecesi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Bu faktörler Tablo 4'de gösterilmiştir (58).

Tablo 4. İlaç hepatotoksitesinde risk faktörleri		
Risk faktörü		Toksosite riski artmış ilaçlar
Yaş	Süt çocuğu-çocuk	Salisilatlar (aspirin), valproik asit
	Yaşlılar (>50 yaş)	İzoniazid, halotan, nitrofrontoin, NSAİİ
Cinsiyet	Kadın	İzoniazid, halotan, metildopa, zidovudine
	Erkek	Azathioprine, amoksisilin-klavulonik asid
Doz, kullanım süresi ve yolu		İntrinsik (doza bağlı) toksosite (parasetamol) Artmış toksik metabolit (izoniazid, dantrolen) Total doz (methotrexate) İntravenöz tetrasiklin
İrk	Asya/Afrika	İzoniazid (yavaş asetilleyiciler)
Hastalıklar	Karaciğer hastalığı Böbrek yetmezliği Aktif romatizmal ateş AIDS	Parasetamol, izoniazid NSAID, allopurinol, tetrasiklin Aspirin Kotrimaksazol, oksasilin, dapsone
Beslenme	Obezite Açlık-malnütrisyon	Halotan, methotrexate Parasetamol (asetaminofen)
Diğer ilaçlar	Alkolizm İzoniazid Antiepileptikler	Parasetamol, izoniazid, methotrexate Parasetamol Parasetamol İzoniazid-rifampisin Valproik asid-kolorpromazin Oral kontraseptifler-troleandomisin
Genetik özellikler/bozukluklar	<ol style="list-style-type: none"> 1. Yavaş asetilleyiciler 2. Üre siklüs bozukluğu 3. Mitokondrial beta-oksidasyon 4. UDP glukuronil transferaz eksikliği 5. Epoksid hidroksilaz eksikliği 6. HLA tipleri 	İzoniazid, debrisoquin, perhexilin maleate Valproik asid Valproik asid, aspirin (çocuklarda) Parasetamol Fenitoin, halotan Nitrofrontoin, halotan, diklofenak

2.5.2.1. İlaç metabolizmasında karaciğer

Karaciğer, gastrointestinal sistem ve splanknik (portal) dolaşım ile periferik organlar ve sistemik dolaşım arasında yer alan, hem hepatik arter hem de portal ven

ile kanlanan bir organdır. Bu nedenle gerek oral gerekse parenteral yolla alınan hemen tüm ilaçlar ve toksik maddelerin ulaştığı bir organdır (58).

Toksik etkileri gözlenen kimyasal maddeler ilaçların çoğu lipofilik (suda erimeyen) ve polar olmayan maddelerdir. Bunların metabolitlerinin vücuttan atılabilmesi için hidrofilik (suda eriyen) hale getirilmesi gerekir. Bunu yapan organ karaciğerdir ve bu işlevinde özelleşmiş kapillerler olan sinüzoidler önemli bir yere sahiptir (59).

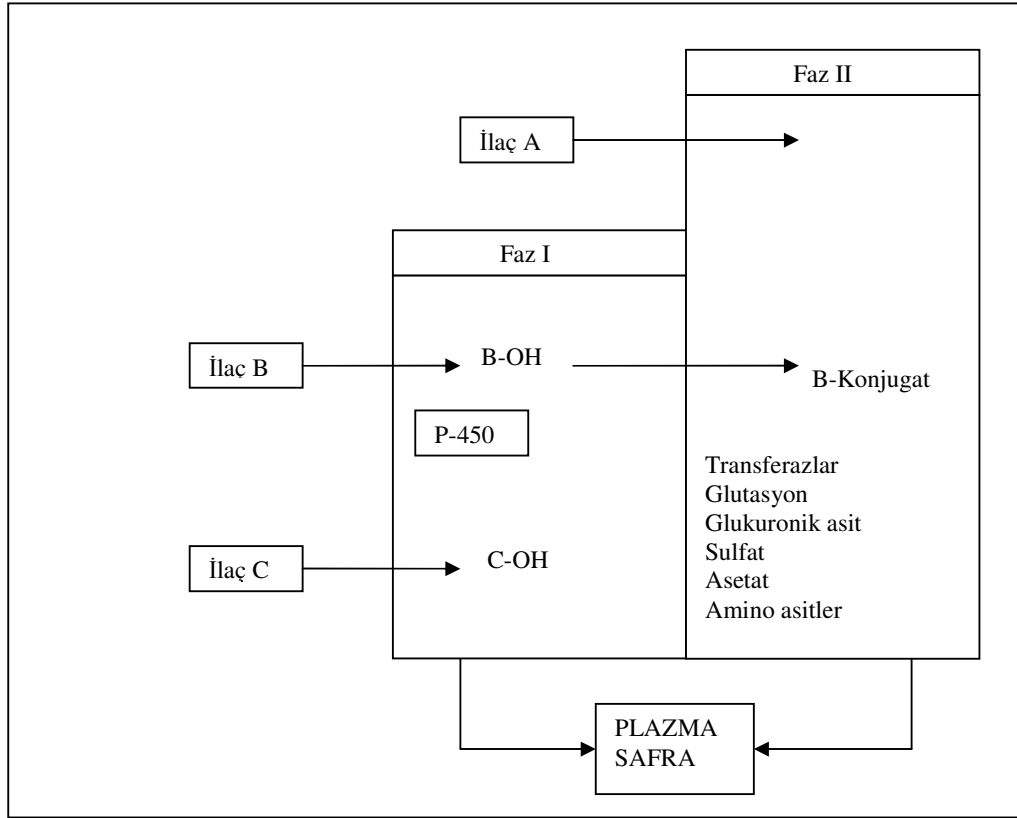
Sinüzoidlere ulaşan ilaçlar geniş aralıklardan Disse mesafesine, oradan da proteinlere bağlanarak aktif veya pasif difüzyonla hepatositlere ulaşır. İlaçlar ve toksik maddeler burada metabolize edilerek (biotransformasyon) suda erir hale gelirler. Bu hidrofilik metabolitler tekrar Disse mesafesi aracılığı ile sinüzoidlere ve sistemik venöz dolaşıma geçerler ve böbreklerden atılırlar. Bazı metabolitler ise safra yolu ile atılırlar.

Klasik görüş, biotransformasyon reaksiyonlarının toksik yabancı bileşikleri daha az ve zararlı olmayan metabolitlere çevirdiği yönündedir. Ancak biotransformasyon ile toksik olmayan ajanlar toksik olan metabolitlere de dönüştürülebilir. Bilinen birçok ajanın, hepatositlerde oluşan ürünleri ve bu dönüşüm esnasında oluşan ara metabolitleri ile toksik etki yaptığı bilinmektedir (60). Biotransformasyonu gerçekleştiren enzim sistemleri düz endoplazmik retikulum (DER)'un içerisinde yer alır. Biotransformasyon genellikle iki fazda gerçekleşir.

Faz I reaksiyonlarda ilaçlar veya toksik bileşikler DER içerisinde yer alan mikrozomal enzimler (sitokrom P450 enzim sistemi ve MFO-“mixed function oxidase” enzim sistemi) tarafından oksidasyon ve hidroksilasyon gibi işlemlerle konjugasyona hazır aktif metabolitler haline getirilirler. Faz II de konjugasyona hazır hale getirilen ilaçlar ve metabolitleri glutatyon, glukuronat, sulfat, glisin, metil grubu veya su ile birleşerek suda erir hale getirilirler ve ekskrete edilirler. Konjugasyon işleminde asetil transferaz, glukuronil transferaz ve sulfotransferazlar gibi enzimler rol oynar. Polar gruplar içeren bileşikler fazI reaksiyonlara uğramadan direkt faz II aşamasına tabi tutulurlar (61).

Bunun yanında faz I de oluşan aktif metabolitler, aktif özellikleri nedeni ile karaciğer hasarı oluşturabilirler. Bu nedenle ki, faz I reaksiyonlar “toksik hale getirme reaksiyonları” ve faz II reaksiyonlar “toksik olmayan hale getirme reaksiyonları” olarak isimlendirilirler (62).

Hepatik ilaç metabolizmasının yolları Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Hepatik ilaç metabolizmasının yolları (Current Gastroenteoloji'den değiştirilerek alınmıştır)

2.5.2.2. İlaç hepatotoksisitesinde patogenezi

Normal şartlarda, karaciğerde metabolize edilen ilaçlardan suda erir stabil metabolitler oluşur ve bunlar vücuttan idrar, safra ve dışkı ile atılırlar. Bu arada reaktif (toksik) metabolik ürünler de oluşur. Bu işleme "bioaktivasyon" denir. Bu toksik metabolitler detoksifikasyon işleminde görevli enzimler tarafından detoksifikasyon işlemine tabi tutulurlar ve vücuttan atılırlar.

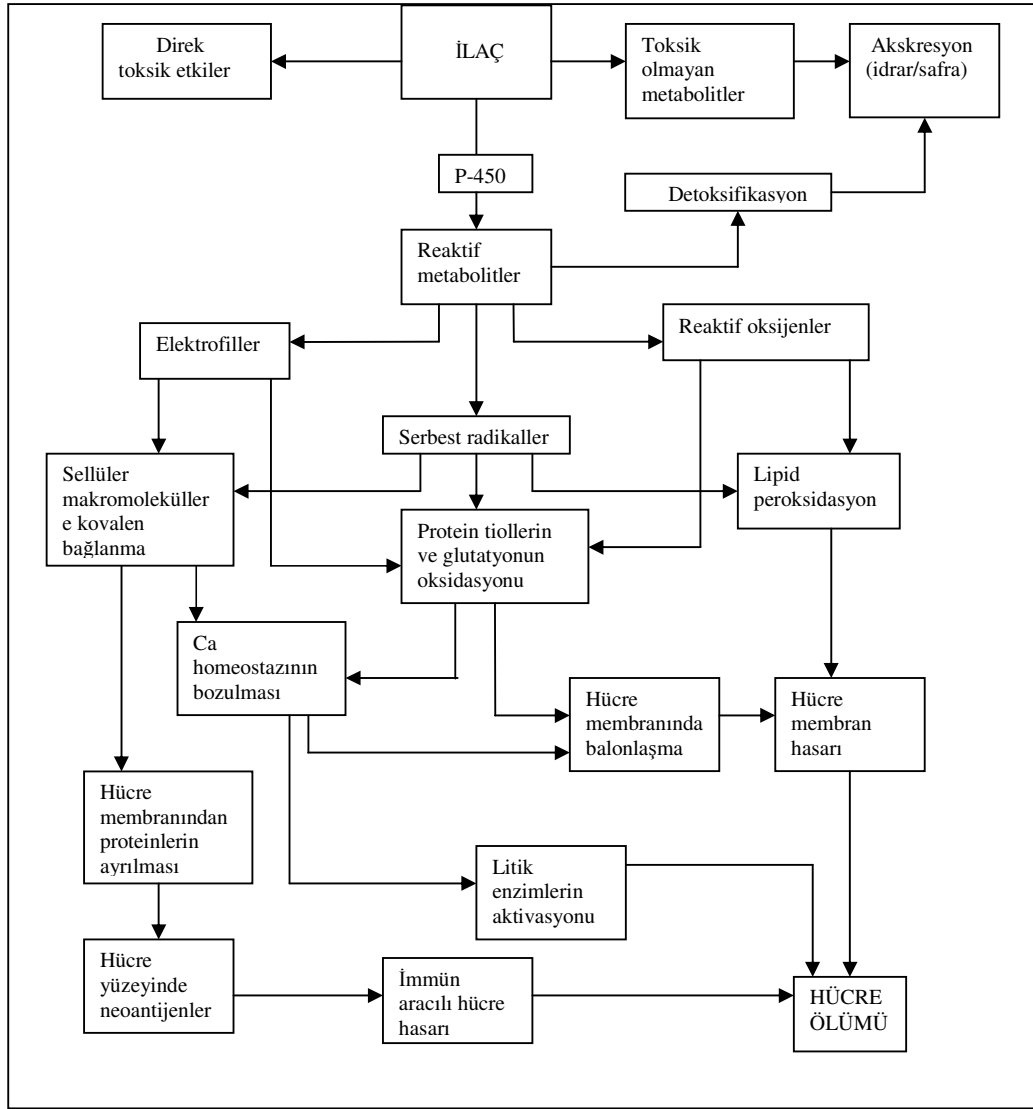
Genel olarak bioaktivasyon ile detoksifikasyon arasındaki denge bozulduğu zaman, biriken toksik metabolitler immünolojik ve/veya non-immünolojik mekanizmalarla hepatobiliyer patolojilere neden olurlar. İlaçlara bağlı gelişen hepatotoksisite mekanizmaları şekil 4'de gösterilmiştir (63).

İlaçlara bağlı karaciğer hasarında ana mekanizmalar şunlardır;

- 1- Stabil-emniyetli metabolit üreten mekanizmalarda eksiklik.
- 2- Reaktif (toksik) metabolitlerin yapımında artış (Faz I enzimleri).

3- Detoksifikasyonda eksiklik-yetersizlik (Faz II enzimleri).

4- Direk toksisite.



Şekil 4. İlaça bağlı hepatotoksisitenin mekanizmaları (Current Gastroenteoloji'den değiştirilerek alınmıştır)

İlaçlara bağlı hepatotoksisite tipleri:

Karaciğer hasarı yapan maddeler öncelikle iki ana gruba ayrılır. Birinci grup karaciğer hasarı yapacağı tahmin edilebilen intrinsek hepatotoksinlerdir. Diğer grup ise karaciğer hasarı yapmaları tahmin edilemeyen ve duyarlı kişilerde karaciğer hasarı oluşturan idiosenkratik hepatotoksinlerdir (64). Bu iki tipin farklı özellikleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. İlaç hepatotoksitesisi tipleri-Patogenez

A-) İNTRENSEK TOKSİSİTE: Direk hepatotoksisite ve indirek hepatotoksisite şeklinde iki tipi vardır. (asetaminofen, aspirin, inorganik Fe, antimikrobik ilaçlar, sitostatikler, anabolik steroidler, tetrasiklin)

- a) Önceden bilinebilir (“predictable”)
- b) Doza bağlıdır ve sık görülür
- c) Deney hayvanlarında oluşturulabilir
- d) Latent dönem sıklıkla kısa ve az değişken

B-) İDYOSİNKRATİK TOKSİSİTE

- a) Önceden bilinemez (“unpredictable”)
- b) Doza bağlı değildir ve sık görülmez
- c) Deney hayvanlarında oluşturulamaz
- d) Latent dönem sıklıkla uzun ve çok değişken

1. Aşırı duyarlılık (“hypersensitivity”) reaksiyonu,

İmmünolojik hasar (holtan, sulfonamidler, sulindak, dapson, fenitoin)

Latent dönem kısa (1-5 hafta)

Alerjik belirtiler vardır (ateş, deri döküntüleri, eozinofili)

Karaciğerde eozinofilik granulomatöz infiltrasyon

İkinci temasta erken toksisite (ilk dozlarda)

2. Aberan metaboizma (izoniazid, valproat, amiodaron, fenitoin)

Latent dönem değişken (1-2 hafta ile 12 ay)

Alerjik belirtiler yok

İkinci temasta geç toksisite (günler-aylar)

İntrensek toksisite:

İntrensek hepatotoksinlerin hemen tamamı metabolitlerinin toksik etkileri ile karaciğer hasarı oluştururlar. Çok az bir kısmı ise biyotransformasyon olmadan hasar oluşturabilirler. Hasar oluşturan aktif ürün; serbest radikal veya oksijen olabilir.

Serbest radikaller hücre zarında lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak nekroza yol açar. Elektrofilik radikaller hepatosit proteinlerinin nükleofilik merkezlerine kovalent olarak bağlanır ve hepatosit nekrozuna yol açar. Aktif oksijen ise serbest radikallere benzer şekilde lipid peroksidasyonuna neden olur (62).

İntrensek hepatotoksinler ve metabolitlerinin oluşturduğu karaciğer hasarı iki farklı şekilde meydana gelir;

1. Direkt hepatotoksisite; serbest radikaller veya aktive olmuş oksijen ile direkt olarak hepatosit membranının peroksidasyonu ve bunun sonucunda oluşan fiziko-kimyasal hasardır.
2. İndirek hepatotoksisite; toksik madde veya metabolitleri indirekt olarak hücre zarına veya hücre moleküllerine bağlanarak, esansiyel gereksinimlerde azalmaya neden olarak, hücre bütünlüğü için gerekli olan fizyolojik/biyokimyasal reaksiyonları bloke ederek karaciğer hasarına yol açar (64).

Direkt hepatotoksinler:

Bu maddeler ve metabolitleri hepatotoksik etkilerini direkt fiziko-kimyasal etkileri ile ve lipid peroksidasyonu yaparak hücre zarında harabiyete neden olurlar. Bu mekanizmanın prototip örneği CCl_4 'dür. CCl_4 hepatosit zarı ve organellerinde hasar oluşturarak iki tip histolojik değişiklik olan steatoz ve nekroza neden olur (64, 65).

Hücre zarında oluşan hasarı, hücre organellerinin zarlarında oluşan hasar takip eder. Bu organel zarlarının hasarlanması sonucu düz endoplazmik retikulum ve mitokondriden kalsiyum salınmasına yol açar. Hücre sitoplazmasında normalden çok fazla miktarda kalsiyum birikimine neden olur. Bu metabolik durum sitoplazmada kalsiyumun artması ve azalmış potasyum sonucunda meydana gelir. Sonuçta aktifleşen enzim-koenzim mekanizmaları mitokondrilerin hasarlanmasına, lizozomlardan açığa çıkan enzimlerde hücre harabiyetine neden olurlar (66).

İndirekt hepatotoksinler:

Bu gruptaki toksik ajanlar, elektrofilik reaktif ara ürünlere dönüşerek hücre zarına veya moleküllere kovalent bağlanarak hasar oluştururlar. Sitotoksik, kolestatik ve mikst olmak üzere üç şekilde karaciğer hasarı oluştururlar. Birçok intrensek hepatotoksin indirekt olarak karaciğer hasarına yol açar. (61, 64) Bizim çalışmamızda kullandığımız thioacetamid de indirekt hepatotoksin grubuna dahil olan ve deneysel amaçla oldukça sık kullanılan bir toksindir.

1- Sitotoksik tip indirekt hepatotoksinler:

Bu maddeler steatoz şeklinde hafif karaciğer zedelenmesinden masif karaciğer nekrozuna kadar değişen şekillerde etkili olurlar. Bu grupta bazı ilaçlar, deneysel amaçla kullanılan bazı bileşikler ve botanikte kullanılan toksinler yer alır. Bu toksinlerin etkileri hücre zarı hasarı ile başlar. Reaktif ara metabolitlerin oluşturduğu hasarın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücre içi mikroçevrenin değişmesi ve sitoplazmadaki artmış kalsiyum iyonu düzeyi hücre nekrozuna yol açar. İndirekt hepatotoksinlere bağlı gelişen steatoz karışık mekanizmalar sonucu meydana gelir. Bu durum çoğunlukla karaciğerden lipitlerin uzaklaştırılmamasına bağlı olarak gelişir. Apoproteinlerin sentezlenmesindeki yetersizlik; VLDL sentezini ve sonuçta karaciğerden lipit taşınmasını bozar. Sonuçta steatoz gelişir. Ayrıca mitokondride yağ asitlerinin oksidasyonundaki azalma da steatoza katkıda bulunur (64).

2- Kolestatik tip indirekt hepatotoksinler:

Bu gruptaki hepatotoksik ajanlar safra kanaliküllerine ekskresyon için gerekli mekanizmaları bozarak etki ederler. Ya safra kanalikül hasarı yaparak veya hepatik up-take'i engelleyerek etkili olurlar. (67)

3- Mikst tip indirekt hepatotoksinler:

Bazı durumlarda hepatosellüler ve portal inflamasyon, kolestazla birlikte bulunabilir. Bir ajan başlangıçta kolestatik reaksiyona yol açarken zamanla parankim hasarına da neden olabilir (65).

İdiosenkratik hepatik toksisite:

Önceden öngörülemeyen bir şekilde ilaçların hepatik hasar oluşturması durumu az sayıda görülür. İdiosenkratik reaksiyon immünolojik veya aberan metabolizma sonucu olarak gelişebilir. Bazı ilaçlar ise her iki mekanizmayıda kullanarak hepatik hasar oluştururlar (58).

2.6. Thioacetamide bağlı hepatotoksisite

Thioacetamide (TAA), indirekt hepatotoksin grubuna dahil olan, tiono-sülfür grubu içeren ve deneysel hepatotoksin olarak sıklıkla kullanılan; verilme süresi ve doza bağlı olarak hepatik nekroz veya siroza neden olan bir hepatotoksik ajandır.

Bu ajan ratlarda AKY modelini oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır (68). Bu madde alkilasyon yaparak sitozol molekülerine kovalent bağlanır ve sonuçta hepatositte nekroz ve steatoz oluşturur. Yine alkilasyon ile nükleer moleküllere bağlanarak uzun vadede kanser gelişimine yol açar (61).

TAA serbest oksijen radikalleri (SOR) artışı ve bunun sonucunda gelişen direkt membran lipidlerinin peroksidasyonu ile doku hasarına neden olur (69, 70). TAA'in hepatik lezyon yapıcı başlıca mekanizmalarından biri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve doku antioksidan düzeylerinin değişerek oksidatif stresin artmasıdır (6, 7, 8). TAA'e bağlı fulminan karaciğer yetmezliğinde, hidroksil radikal temizleyici dimetilsülfoksit ve dimetiltiyüre'nin (7) güçlü bir serbest radikal temizleyici olan melatonin'in (9), bir antioksidan olan curcumin'in (10) sürviyi iyileştirirken, oksidatif stresi, hepatoselüler yıkımı ve hepatik nekroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir.

Ayrıca, curcumin'in, NF- κ B bağlanması ve iNOS ekspresyonunu azalttığı da saptanarak, sıçan TAA-karaciğer yetmezliği modelinde, reaktif oksijen radikalleri yanı sıra, NF- κ B ve iNOS'un karaciğer yıkımında aracı olduğu ileri sürülmüştür (10).

Başka bir sıçan fulminan karaciğer yetmezliği modelinde ise, bir antioksidan ve NF- κ B aktivasyon inhibitörü olan pirolidin ditiyokarbamat'ın (PDTC) karaciğer haraplanmasını azalttığı ve sürviyi iyileştirdiği gösterilmiştir (8).

2.7. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres

Serbest radikaller, orbitallerinde eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan maddelerdir. Genellikle radikal olmayan herhangi bir molekül veya atoma elektronun girmesi çıkması ile meydana gelirler. İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O₂), yapısı itibarıyla radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri (SOR) akla gelmektedir. Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan SOR ile antioksidan defans sistemi bir denge halindedir. Yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)'in aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), nitrik okit sentaz (NOS) ve MPO gibi

enzimler süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve hidroklorik asit (HOCl) gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (71, 72, 73) Aşırı reaktif bu maddeler diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirip kararsız (reaktif) bir atom haline getirme eğilimindedirler.

Serbest radikaller hücrede lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir (74, 75). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres”, sonuçta bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını meydana getirir.

Oksidatif hasarın olduğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur; geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelişir (74, 76). Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara da yol açtığı bilinmektedir (77, 78). Bu bağlamda SOR'nin düzeylerini arttırıcı etkenler olarak özellikle oksidatif strese yol açan nedenlerin bilinmesi, bunlardan uzak durulması oldukça önemlidir.

2.7.1. Serbest oksijen radikal kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin eksojen ve endojen kaynakları mevcuttur.

Eksojen kaynaklar:

- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler: Alkol, uyuşturucu vb.
- Ksenobiyotikler: Hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı vb.
- Antineoplastik ajanlar
- Stres; strese katekolamin düzeyi artar, artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi artmaktadır.

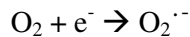
Endojen kaynaklar:

- Mitokondrial elektron transport sistemi
- Oksidatif stres durumları (iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumlara bağlı olarak)
- Peroksizomlarda bulunan enzimler
- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vb.
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler vb.
- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vb. Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda SOR oluşur (79).

2.7.2. Serbest oksijen radikal türleri

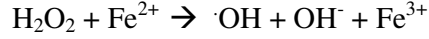
Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. İskemi, hemoraji, intoksikasyon, radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerde aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları oluşur. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, $O_2^{\cdot-}$) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur (80).



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktifi ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini (OH[·]) oluşturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (81).

2.7.3. Serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkileri

Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler:

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlara serbest radikallerin etki etmesi lipid peroksidasyonu üzerinden membranların poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açabilir.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (82).

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. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO[·]) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (82). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile rölatif olarak daha stabil olan son ürün malondialdehid oluşur (82). Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (83). 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 oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da 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.

Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler:

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 (84). Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (85).

2.8. Antioksidan Sistemler

Antioksidan sistemler enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Nonenzimatik antioksidan sistem içerisinde; E vitamini, C vitamini, seruloplazmin, transferin, ürik asit, albumin, bilirubin, glukoz, piruvat, taurin, β-Karoten, melatonin, glutatyon ve sistein gibi moleküller yer alır.

2.8.1. Enzimatik Antioksidanlar

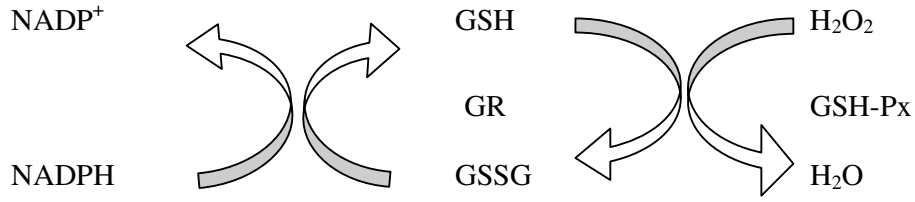
Başlıca antioksidan enzimler; Glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD)'dir (86).

Glutatyon Peroksidaz:

GPX yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir. Bu reaksiyon Şekil 5'de gösterilmiştir. GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda glutatyon peroksidaz enzimi hidrojen peroksiti suya indirger. Daha sonra glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (86).

Reaksiyon şu şekildedir;

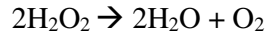




Şekil 5: Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

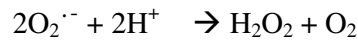
Katalaz:

Katalaz enzimi, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Özellikle hidrojen peroksite yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (87). 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 (GPX gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (88). Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkili iken, GPX enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Süperoksit Dismutaz:

Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Hücreyi radikallerin etkisinden koruyan savunma mekanizması arasında SOD enzimi ilk rolü oynar. SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün birikimi CAT enzimi tarafından önlenmektedir. SOD enzimi metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundandır. İnsanda Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD ilk defa 1969 yılında McCord ve Fridovic tarafından tanımlanmıştır (89). Ökaryotlarda en son 3 SOD

izofomu tanımlanmaktadır. Bunlar ekstrasellüler SOD (ec-SOD), sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (90).

2.9. Hepatotoksisite ve sitokinler

Sitokinler; doğal ve adaptif immünyetede rol alan ve hücrelerin immün fonksiyonlarını düzenleyen protein yapısında olan moleküllerdir. Bu moleküller lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda ve hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol oynarlar. Köken aldıkları hücrelere göre monokin, lenfokin ve interlökin olarak adlandırılırlar. Genel anlamda sitokinler biyolojik yanıt değiştiricilerdir (91).

Sitokinler organizmanın savunması için gerekli olan maddelerdir. Fakat aşırı miktarlarda salınmaları karaciğer üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilir. Pek çok sitokin stimulus bağımlı olarak karaciğerde lokal olarak üretilir (92).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, toksine bağlı karaciğer hasarında Kupffer hücreleri ve onların sekretuar ürünlerinin karaciğer hücre hasarına katkıda buldukları gösterilmiştir. Kupffer hücreleri kalıcı makrofajlardır ve total karaciğer hücre miktarının %15'ini oluştururlar. Genellikle bu hücreler periportal alanda yerleşiktirler, ancak karaciğerin tüm alanlarında bulunabilirler. Portal sistemden fagositoz ile aldıkları yabancı maddeleri detoksifiye ederler ve antijenlerin yıkımına yardım ederler. Aktive olan Kupffer hücreleri ; reaktif oksijen ara ürünleri, sitokinler ve proteolitik enzimler üretirler. Reaktif ürünlerin ortama salınması ile Kupffer hücreleri toksik karaciğer hasarında modülatuar rol oynar (93).

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) Kupffer hücrelerinde sentezlenir ve karaciğer hasarı ile ilgilidir. Örneğin canlı veya ölü gram negatif bakteriler TNF- α sentezini belirgin oranda arttırırlar (94).

Kupffer hücrelerinde sentezlenen proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1, IL-6); akut faz proteinlerinin sentezi ve sinüzoidlerde nötrofillerin artmış adezyonu gibi inflamatuvar olayları indüklerler. TNF- α ve IL-1 en fazla nekroz ve metabolik değişikliklerden etkilenir (95).

IL-6 ise akut faz proteinleri sentezi üzerinde en güçlü uyarandır (96).

TNF- α 'nın pek çok biyolojik aktivitesi olmasına karşın bunlardan en önemlisi apoptotik veya nekrotik hücre ölümünü indüklemesidir. TNF- α pek çok kanser hücresi için sitotoksiktir. Fakat normal hücreler üzerinde böyle bir etkisi yoktur.

Bununla birlikte hücrede RNA veya protein sentezi inhibe olduğunda, karaciğer hücrelerinin de dahil olduğu bu hücreler TNF- α sitotoksitesi için daha sensitif bir hale gelirler (97).

Hepatotoksik ilaçlarla sonuçlanan hepatosellüler hasar ve hücre nekrozunun oluşumunda TNF- α 'nın etkili olduğuna dair pek çok deneysel kanıt vardır.

Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF- α 'nın, akut fulminan hepatitte hücre yıkımında rol aldığı düşünülmektedir (14, 15).

Sıçanlarda TAA ile uyarılan fulminan karaciğer yetmezliğinde endotoksin ve TNF- α 'nın, hepatic ansefalopatinin patogenezine katıldıkları gösterilmiştir.

Sıçanlarda 3 kez, 350 mg TAA ile uyarılan fulminan karaciğer yetmezliğinde yüksek endotoksin ve TNF- α düzeyleri ile ensefalopati şiddeti arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Endotoksin ve TNF- α konsantrasyonları arasında da doğrusal ilişki bulunmuştur (16).

Tumör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α):

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. TNF- α , endotel aktivasyonuna yol açarak, nitrik oksit (NO) salınımını ve inflamasyonu körükler, prokoagülan ortam hazırlar, fibroblastları uyararak kollagen sentezini artırır ve lökositleri aktive ederek inflamatuvar sitokin salınımına yol açar (98).

TNF- α ayrıca, apoptozisin ekstrinsek yolağında, özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi (99), intrinsek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktifleştirmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir. Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'nın antagonistleri, antiapoptotik etkinlik göstermektedirler.

3. MATERİYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Proje Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nca onaylandı .

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 10-12 haftalık, 78 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) bulunduruldu ve standard sıçan yemi ile beslendi.

TAA'e bağlı karaciğer lezyonunda kefirin etkisini test etmek için rastgele örnekleme metoduyla 48 sıçan alınarak, üç adet altılı ve üç adet onlu toplam 6 gruba ayrıldı. Ayrıca, 30 sıçanda sürvi tayini yapıldı. Çalışmanın başında ve sonunda sıçanların ağırlıkları kaydedildi.

3.1.2. Kefirin hazırlanması

Kefir için 10 litre süt Isparta süt ürünleri fabrikasından temin edildi ve cam kavanozlara kondu. Aynı gün içinde süt ısısı 25 °C 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 C⁰'de 14 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra ürün filtreden süzülerek plastik kaba kondu ve + 4 °C'de, çalışma süresince kullanılmak üzere saklandı. Kefir çalışma süresince, kullanımdan önce her defasında homojenize edildi.

İçme suyu yerine kefir verilecek gruplarda kefir %10 ve %20 dilüsyonlarda kullanıldı. Kefir dilüsyonları, phosphate-buffered saline (PBS) solüsyonunda yapıldı. Kefir solüsyonları 12 saatte bir yenilendi. Tüm gruplarda günlük tüketilen sıçan yemi, çeşme suyu ve kefir miktarları kaydedildi.

Tüm gruplarda öldürülme işlemlerinden 12 saat önce katı besin, 2 saat önce de çeşme suyu ve kefir alımları kesildi.

3.1.3. Kullanılan malzeme ve aletler

Deneyde kullanılan malzemeler ve markalarıyla üretildikleri ülkeler Tablo 6'da özetlenmiştir.

Sıra No	Malzeme/Alet	Marka/Ülke
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), Eppandörf
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)

3.2. Metod

3.2.1 Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışmada I. Deneyde 6, II. Deneyde üç grup oluşturuldu.

Grup 1: Normal kontrol (NK)

Grup 2: %10 Kefir-Kontrol (%10K)

Grup 3: %20 Kefir-Kontrol (%20K)

Grup 4: TAA

Grup 5: TAA-%10 K

Grup 6: TAA-%20 K

Deney I:

Grup 1 (Kontrol, n=6): 7 gün standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar çeşme suyu ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı.

Grup 2 (%10 Kefir Kontrol, n=6): 7 gün standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar 1/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı.

Grup 3 (%20 Kefir Kontrol, n=6): 7 gün standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar 2/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı.

Grup 4 (TAA hepatiti, n=10): 7 gün standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar çeşme suyu ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı. (Bu sıçanlara, 6. ve 7. günlerde; kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden korumak için her 12 saatte bir 10 ml/kg-sıçan %5 dekstroz ve 10 ml/kg-sıçan 20 mEq/L potasyum eklenmiş %0.9 NaCl sc enjekte edildi).

Grup 5 (TAA hepatiti+%10Kefir, n=10): 7 gün standard sıçan yemi ve içme suyu olarak gereksinim duydukları kadar 1/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı. (Bu sıçanlara, 6. ve 7. günlerde; kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden korumak için her 12 saatte bir 10 ml/kg-sıçan %5 dekstroz ve 10 ml/kg-sıçan 20 mEq/L potasyum eklenmiş %0.9 NaCl sc enjekte edildi).

Grup 6 (TAA hepatiti+%20Kefir, n=10): 7 gün standard sıçan yemi ve içme suyu olarak gereksinim duydukları kadar 2/10 kefir eklenmiş PBS ile beslendi; 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi; 8. gün hayvanlar öldürülerek kan ve karaciğer dokusu örnekleri alındı. (Bu sıçanlara, 6. ve 7. günlerde; kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden korumak için her 12 saatte bir 10 ml/kg-sıçan %5 dekstroz ve 10 ml/kg-sıçan 20 mEq/L potasyum eklenmiş %0.9 NaCl sc enjekte edildi).

Deney II (Sürvi Tayini):

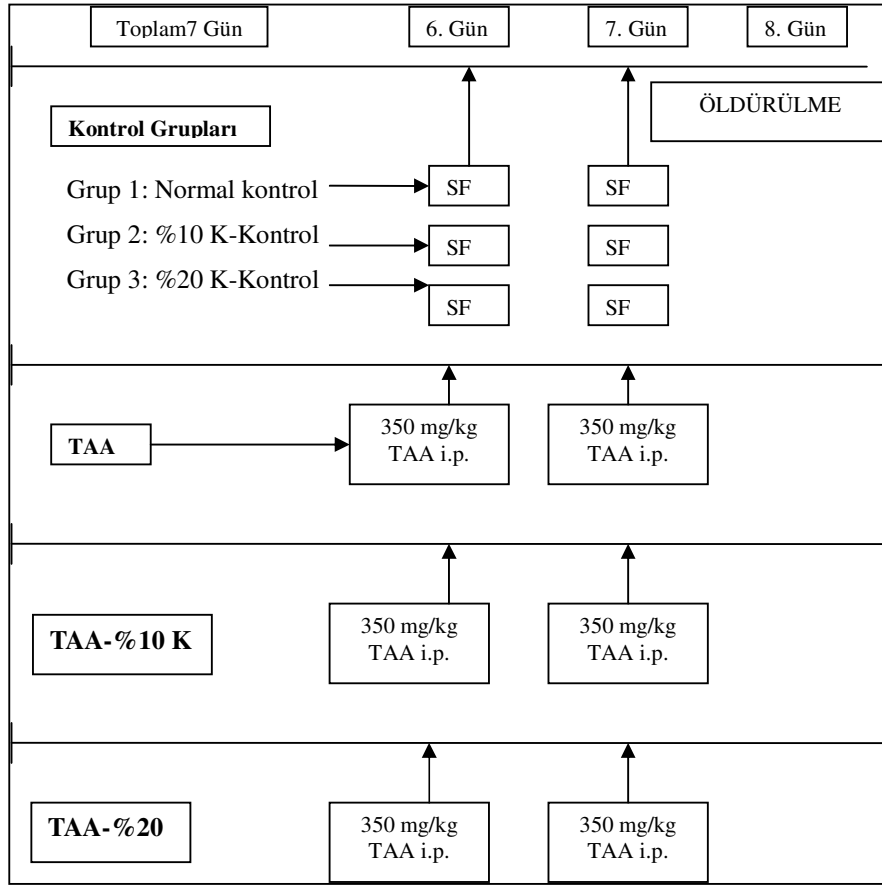
Kefirin TAA'ye bağı akut karaciğer yetmezliğinde, sürviye etkisini belirlemek için 10'ar sıçandan oluşan üç grup oluşturuldu.

Grup 1 (TAA): Standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar çeşme suyu ile beslendi. Deneyin 6. ve 7. günlerde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi. İlk enjeksiyondan sonra, 120 saat gözlendi (11. gün sonuna kadar). Ölüm olayları kaydedildi.

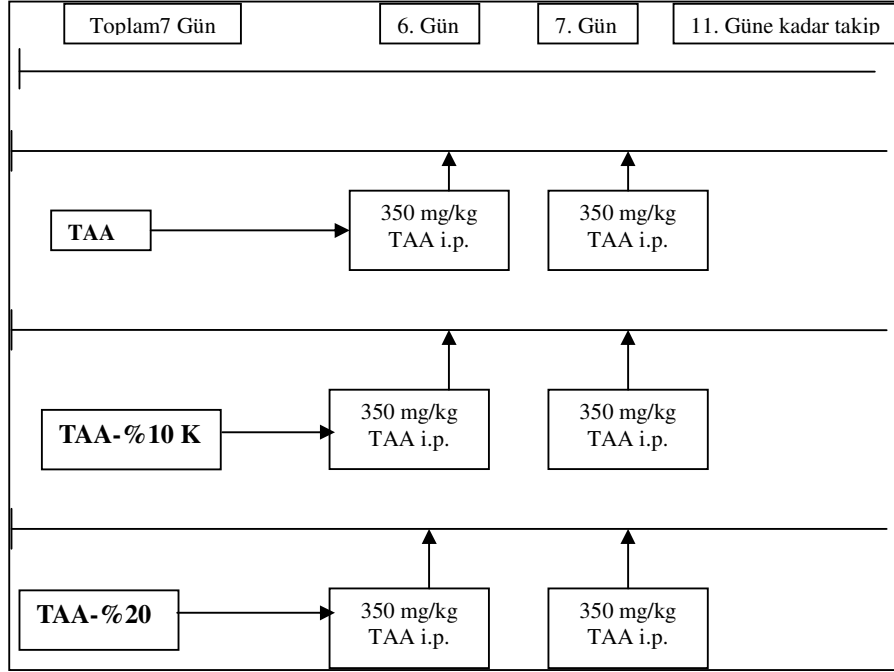
Grup 2 (TAA-%10K): Standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar %10 kefir solüsyonu ile beslendi. Deneyin 6. ve 7. günlerinde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi. İlk enjeksiyondan sonra, 120 saat gözlendi (11. gün sonuna kadar). Ölüm olayları kaydedildi.

Grup 3 (TAA-%20K): Standard sıçan yemi ve gereksinim duydukları kadar %20 kefir solüsyonu ile beslendi. Deneyin 6. ve 7. günlerinde ip 1 cc %0.9 NaCl içinde eritilen 350 mg/kg TAA enjekte edildi. İlk enjeksiyondan sonra, 120 saat gözlendi (11. gün sonuna kadar). Ölüm olayları kaydedildi.

Ayrıca her üç gruptaki sıçanlara, 6. günden itibaren yaşadıkları müddetçe; kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden korumak için her 12 saatte bir 10 ml/kg-sıçan %5 dekstroz ve 10 ml/kg-sıçan 20 mEq/L potasyum eklenmiş %0.9 NaCl sc enjekte edildi.). Deney I protokolü Şekil 6'da, Deney II protokolü Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 6. Deney I uygulama şeması.



Şekil 7. Deney II uygulama şeması

3.2.2. Doku ve örneklerin çıkarılması

Sekizinci gün sabah 09.00-10.00 arasında sıçanlar i.p. ketamin 80 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg ile anesteziye edildi. Daha sonra orta hat insizyonuyla batınları açıldı. Vena cava inferior'dan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri, -20C'da saklandı.

3.2.3. Biyokimyasal analiz yöntemleri

Vena cava inferiordan alınan kan örneklerinde çalışılan testler:

Karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek için, serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalin fosfataz (ALP) ve total bilirübin düzeyleri, ticari kit kullanılarak otoanalizörde ölçüldü.

Protrombin zamanı (PT) ve INR kromojenik yöntemle koagülometre cihazında tayin edildi.

Karaciğer dokusunda çalışılan testler:

Karaciğer inflamasyonunu (nötrofil aktivitesini) biyokimyasal olarak değerlendirmek için karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ELİZA ile araştırıldı.

Karaciğer dokusunda TNF-alfa ve İL-10, ELİSA ile çalışıldı.

Karaciğer oksidatif stresini değerlendirmek için, malondialdehit (MDA) HPLC ile, glutatyon konsantrasyonu Ellman reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) ticari kit kullanılarak spektrofotometrik olarak, katalaz Aebi yöntemi kullanılarak ölçüldü.

3.2.4. Karaciğerin çıkarılması

Steril şartlarda sıçanların karaciğerleri çıkarıldı. Çıkarılan karaciğerler serum fizyolojik ile yıkandı. Hassas terazi ile ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Sağ karaciğer lobu histopatolojik incelemeler, sol karaciğer lobu biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.2.5. 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 hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400 büyütmede) incelendi.

Hepatoselüler nekroz derecesi, deney protokolü ve gruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog (M.Ç.) tarafından değerlendirmeye alındı. Histopatolojik değerlendirmede nekroz derecesi 0 (sıfır)'dan 5'e kadar oluşturulan bir sınıflandırma kullanılarak incelendi (100). Bu sınıflandırma Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Karaciğer nekroz derecesinin sınıflandırılması.

Derece 0	Portal alanda nekroz yok
Derece 1	Minimal nekroz, birkaç hücre
Derece 2	Hafif derecede nekroz, < 1/3 den az
Derece 3	Orta derecede nekroz, 1/3-2/3 arası
Derece 4	Şiddetli derecede nekroz, >2/3 den fazla
Derece 5	Çok şiddetli derecede nekroz, çoğu

3.3. 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

Deney I'i oluşturan sıçan gruplarında öldürme işlemine kadar geçen sürede ölüm olmadı. Deneyin 4. gününde TAA-%10K grubunda 9 nolu sıçanın sağ göz çevresinde, ağız ve boyun bölgesinde üzeri kurutlu ülsere lezyonlar tespit edildi. Muhtemelen diğer sıçanlar tarafından ısırılmış olabileceği düşünüldü. Deneyin 7. gününde TAA grubunda 3 nolu sıçanda, TAA-%10K grubunda bir nolu sıçanda ve TAA-%20K grubunda 9 nolu sıçanda kan içermeyen ishal tespit edildi.

Öldürme sabahı (Deneyin 8. günü) TAA grubunda 10 nolu sıçanın ve TAA-%20K grubunda 7 nolu sıçanın genel durumları ve hareket kabiliyetlerinin bozulmuş olduğu gözlemlendi.

Deney II'yi oluşturan sıçan gruplarında, deneyin 7. günü TAA grubunda 8 nolu sıçanda ve TAA-%20K grubunda 10 nolu sıçanda kan içermeyen ishal saptandı. Deneyin 8. gününde TAA grubunda 4 ve 7 nolu sıçanlar, TAA-%10K grubunda 4, 5 nolu sıçanlar ve TAA-20KF grubunda 1 nolu sıçan öldü. Aynı gün TAA grubunda 2 ve 6 nolu sıçanlarda ishal, TAA-%10K grubunda 5 nolu sıçanda kanlı ishal, TAA-%20K grubunda 3 nolu sıçanda ishal ve 9 nolu sıçanda ürogenital hemoraji tespit edildi.

Sonuçta TAA grubunda toplam iki, TAA-%10K grubunda iki ve TAA-%20K grubunda bir sıçan öldü.

4.1. Sıçanların gruplara göre tükettikleri günlük çeşme suyu, kefir ve yem miktarları

Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Sıçanların gruplara göre tükettikleri günlük çeşme suyu, kefir ve yem miktarları				
Gruplar	Çeşme Suyu (cc)	% 10 Kefir (cc)	% 20 Kefir (cc)	Sıçan Yemi (gr)
Normal kontrol	40			20
%10 K-Kontrol		42		19
%20 K-Kontrol			45	21
TAA	30			17
TAA-%10 K		32		16
TAA-%20 K			34	16

4.2. Sıçanlardaki ağırlık değişiklikleri

Deney grupları arasında deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıkları açısından anlamlı farklılaşma saptanmadı. Deney sonrası-öncesi ağırlık değişim oranları açısından da önemli fark yoktu. Bulgular Tablo 9’da gösterilmiştir.

Gruplar	Çalışma öncesi (gr)	Çalışma sonrası (gr)	Ağırlık değişimi (%)
Normal kontrol	207±22	215±21	4,11±1,74
%10 K-Kontrol	201±14	205±11	2,18±1,79
%20 K-Kontrol	203±14	215±13	6,32±1,78
TAA	175±9	175±7	0,07±1,27
TAA-%10 K	174±9	173±8	-0,32±2,46
TAA-%20 K	175±9	175±9	-0,29±1,24

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 arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Buna karşılık karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranına bakıldığında NK, %10K ve %20K grupları ile TAA, TAA-%10K VE TAA-%20K grupları arasında anlamlı farklılaşma olduğu gözlemlendi (p<0.05). TAA alan gruplarda vücut ağırlığına oranla karaciğer ağırlığı artmış olarak gözlemlendi. Karaciğer ağırlıkları Tablo 10’de gösterilmiştir.

Gruplar	Karaciğer ağırlığı(gr)	Karaciğer/vücut ağırlığı oranı (%)
Normal kontrol	7,2±0,6	3,4±0,2
%10 K-Kontrol	7,1±0,3	3,5±0,1
%20 K-Kontrol	7,6±0,4	3,6±0,2
TAA	8,1±0,3	4,7±0,1 ¹
TAA-%10 K	8,0±0,4	4,7±0,2 ¹
TAA-%20 K	8,2±0,4	4,7±0,1 ¹

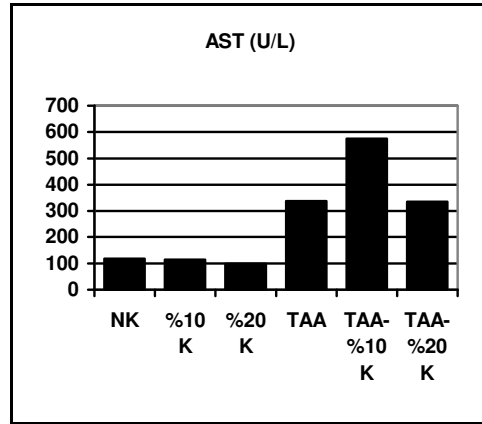
¹NK, %10K ve %20K gruplarına göre p<0.05

4.4. Karaciğer fonksiyon testleri

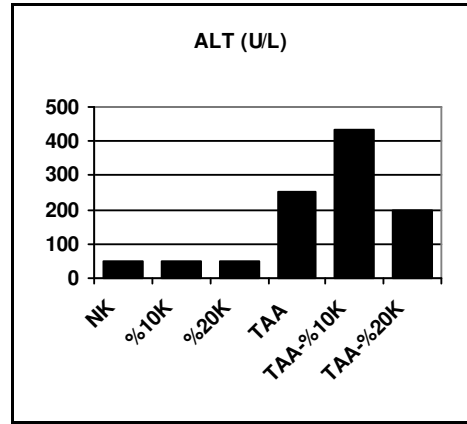
Serum AST ve ALT değerleri TAA-%10K grubunda, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptandı (P<0.05). Bu bulgu TAA verilen ratlarda akut hepatit geliştiğini açıkça gösteriyordu. TAA verilen diğer iki grupta (TAA ve TAA-%20K) serum AST ve ALT değerleri kontrol gruplarına oranla yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine serum ALP değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Karaciğer fonksiyon testleri Tablo 11’de ve Şekil 8, 9 ve 10’da gösterilmiştir.

Gruplar	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
Normal kontrol	118±9	52±5	221±23
%10 K-Kontrol	114±6	52±6	267±44
%20 K-Kontrol	98±5	50±3	293±27
TAA	337±72	252±66	296±14
TAA-%10 K	575±115 ^{1,2,3}	432±124 ^{4,5,6}	355±59
TAA-%20 K	334±58	197±59	416±81

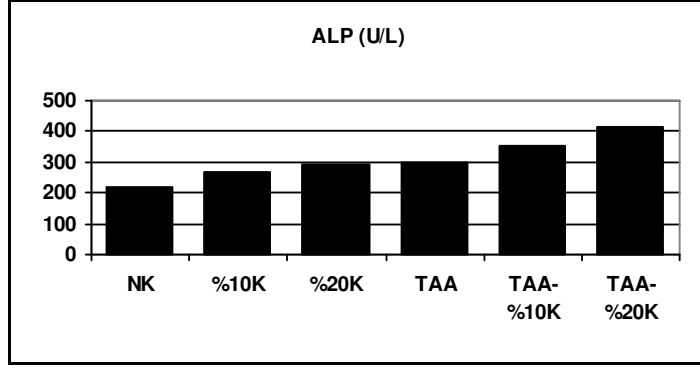
Veriler, ortalama ± hata olarak verilmiştir. ¹NK grubuna göre p=0.002, ²%10K grubuna göre p=0.002, ³%20K grubuna göre p=0.01, ⁴NK grubuna göre p=0.16, ⁵%10K grubuna göre p=0.17, ⁶%20K grubuna göre p=0.16.



Şekil 8. Serum AST seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması



Şekil 9. Serum ALT seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması



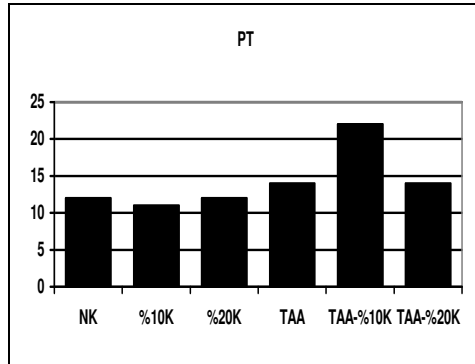
Şekil 10. Serum ALP seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması

PT ve INR değerleri TAA-%10K grubunda, kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede yüksek saptandı ($P<0.05$). Total bilirubin değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

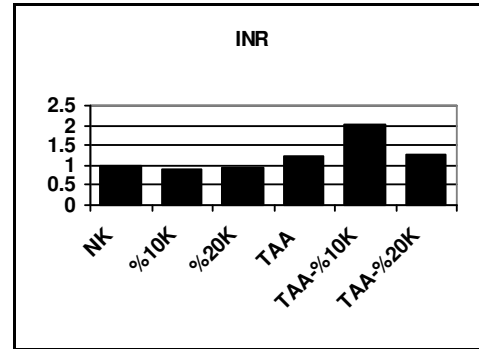
Karaciğer fonksiyon testlerinden PT, İNR ve total bilirubin ile ilgili değerler Tablo 12’de ve şekil 11 ve 12’de gösterilmiştir.

Gruplar	PT (sn)	INR	Total bilirubin
Normal kontrol	12±0,3	0,98±0,03	0,01±0,00
%10 K-Kontrol	11±0,09	0,9±0,02	0,01±0,00
%20 K-Kontrol	12±0,2	0,96±0,02	0,01±0,00
TAA	14±0,47	1,23±0,05	0,03±0,01
TAA-%10 K	22±4,27 ¹	2,04±0,43 ²	0,02±0,01
TAA-%20 K	14±0,33	1,26±0,04	0,07±0,03

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹Kontrol gruplarına göre $p<0.05$, ²Kontrol gruplarına göre $p<0.05$



Şekil 11. Serum PT seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması



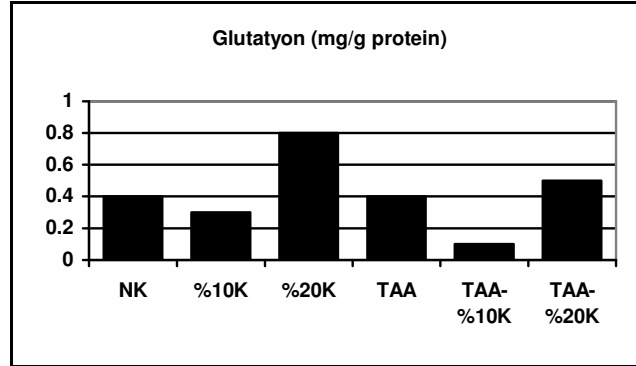
Şekil 12. Serum INR seviyelerinin gruplara göre karşılaştırması

4.5. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri

Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyi, %20K grubunda diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. TAA-%10K grubunda ise diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı. Gruplara göre karaciğer glutatyon düzeyleri Tablo 13 ve Şekil 13’de gösterilmiştir.

Gruplar	Glutatyon (mg/g protein)
Normal kontrol	0,4±0,1
%10 K-Kontrol	0,3±0,0
%20 K-Kontrol	0,8±0,1 ¹
TAA	0,4±0,1
TAA-%10 K	0,1±0,0 ²
TAA-%20 K	0,5±0,1

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹Diğer tüm gruplara göre $p<0.05$, ²Diğer tüm gruplara göre $p<0.05$.



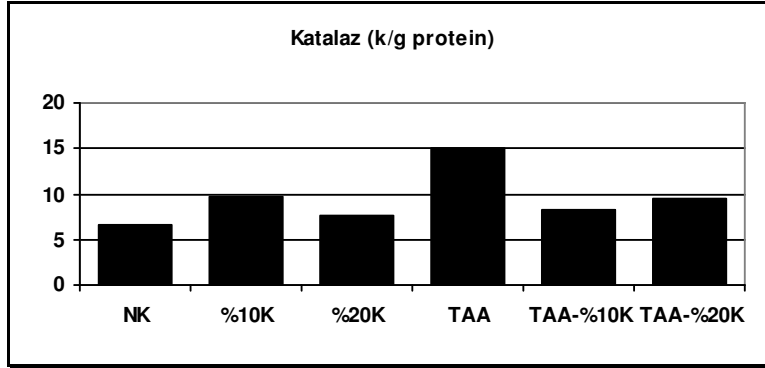
Şekil 13. Karaciğer dokusunda glutatyon aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

4.6. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri

Karaciğer dokusunda katalaz düzeylerinde, TAA grubunda kontrol gruplarına oranla yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Karaciğer dokusunda katalaz düzeyleri Tablo 14 ve Şekil 14’de gösterilmiştir.

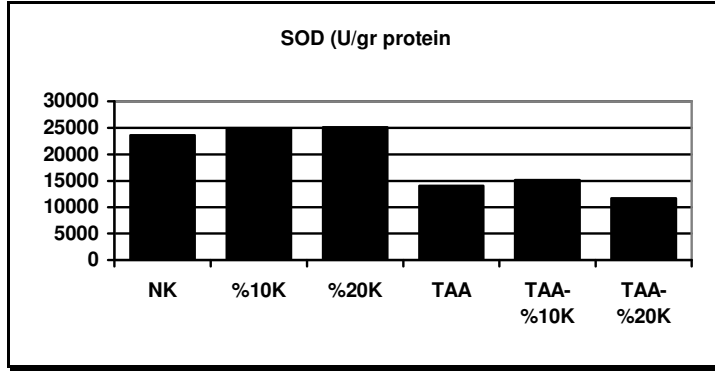
Gruplar	Katalaz (k/g protein)	SOD (U/gr protein)	GPX (U/g protein)
Normal kontrol	6,7±1,4	23638±1811	10,6±1,4
%10 K-Kontrol	9,6±1,5	24932±557	8,3±1,1 ³
%20 K-Kontrol	7,7±1,4	25119±455	9,1±1,3 ³
TAA	15,1±4,4	14049±1549 ¹	19,1±2,5
TAA-%10 K	8,3±1,4	15143±1893 ¹	20,8±2,3 ²
TAA-%20 K	9,5±1,7	11698±432 ¹	20,1±2,1

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹Kontrol gruplarına göre p<0.05 ² NK grubua göre p<0.05, ³TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarına göre p<0.05. SOD: Süperoksit dismutaz, GPX: Glutasyon peroksidaz.



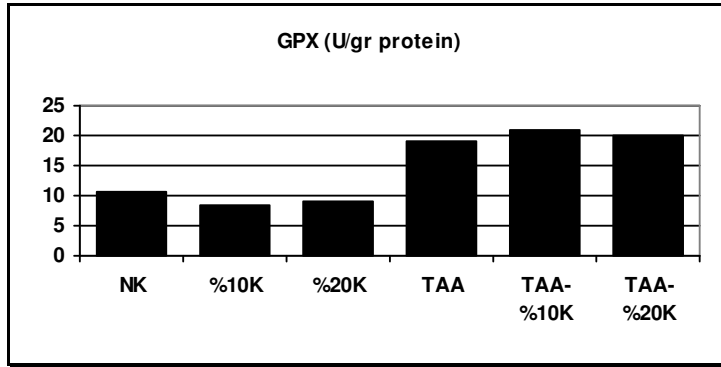
Şekil 14. Karaciğer dokusunda katalaz aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri, NK, %10K ve %20K gruplarına oranla TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında anlamlı düzeyde (p<0.05) düşük saptandı. Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri Tablo 14 ve Şekil 15’de gösterilmiştir.



Şekil 15. Karaciğer dokusunda SOD aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

Karaciğer dokusunda GPX düzeyi, NK grubunda TAA-%10K grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı. Yine GPX düzeyi, %10K ve %20K gruplarında TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarına oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük olarak saptandı. Karaciğer dokusunda GPX düzeyleri Tablo 14 ve Şekil 16'de gösterilmiştir.



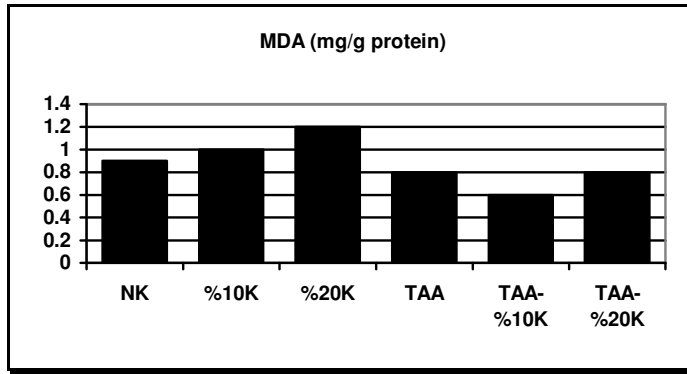
Şekil 16. Karaciğer dokusunda GPX aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

4.7. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi, %20K grubunda TAA-%10K grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri Tabo 15 ve şekil 17'de gösterilmiştir.

Gruplar	MDA(mg/g protein)
Normal kontrol	0,9±0,1
%10 K-Kontrol	1,0±0,1
%20 K-Kontrol	1,2±0,2 ¹
TAA	0,8±0,2
TAA-%10 K	0,6±0,1
TAA-%20 K	0,8±0,1

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹TAA-%10K grubuna göre p=0.025.



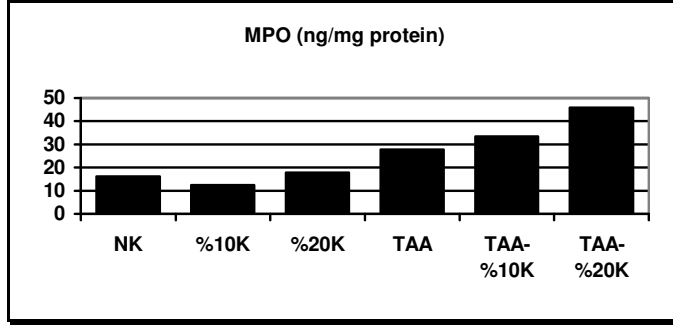
Şekil 17 Karaciğer dokusunda MDA aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

4.8. Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri

MPO düzeyleri TAA-%10K grubunda, %10K grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. TAA-%20K grubunda ise NK, %10K ve %20K grupların oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılaşma saptanmadı. Karaciğer doku homojenatlarında bakılan MPO seviyeleri Tablo 16'da ve Şekil 18'de gösterilmiştir.

Tablo 16. Karaciğerde myeloperoksidaz aktivitesi	
Gruplar	MPO (ng/mg protein)
Normal kontrol	16,1±2,0
%10 K-Kontrol	12,5±1,1
%20 K-Kontrol	17,8±1,8
TAA	27,8±2,5
TAA-%10 K	33,4±6,0 ¹
TAA-%20 K	45,8±6,0 ^{2,3,4,5}

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ¹%10K grubuna göre p=0,039, ²NK grubuna göre p=0,001, ³%10K grubuna göre p=0,0001, ⁴%20K grubuna göre p=0,002, ⁵TAA grubuna göre p=0,04.



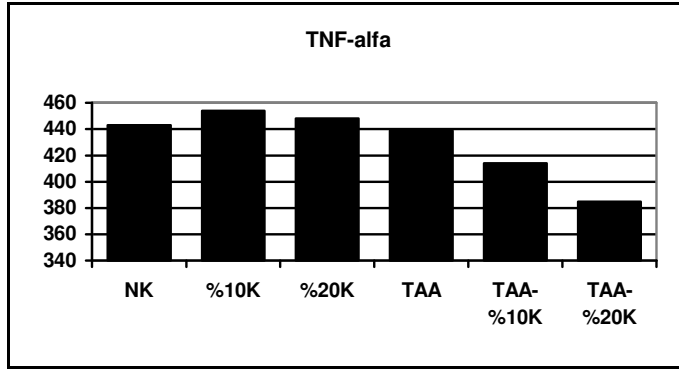
Şekil 18. Karaciğer dokusunda MPO aktivitesinin gruplara göre karşılaştırılması

4.9. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında düşük düzeyde olmalarına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri tablo 17 ve şekil 19’da gösterilmiştir.

Tablo 17. Karaciğer dokusunda TNF-α düzeyleri	
Gruplar	TNF-α (pg/mgprotein)
Normal kontrol	443±25
%10 K-Kontrol	454±30
%20 K-Kontrol	448±14
TAA	439±15
TAA-%10 K	414±27
TAA-%20 K	385±32

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir



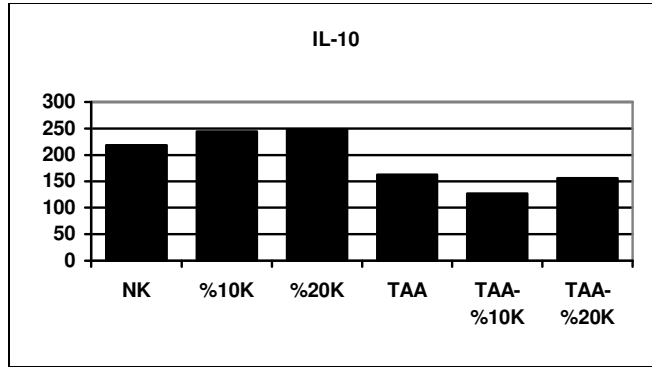
Şekil 19. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyinin gruplara göre karşılaştırılması

4.10. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri

Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri, %10K ve %20K gruplarına oranla TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşük olarak saptandı. Yine NK grubuna oranla TAA-%10K grubunda IL-10 düzeyi anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşük saptandı. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri Tablo 18 ve Şekil 20’de gösterilmiştir.

Gruplar	IL-10 (pg/mgprotein)
Normal kontrol	218 \pm 24 ¹
%10 K-Kontrol	244 \pm 25 ²
%20 K-Kontrol	248 \pm 21 ²
TAA	163 \pm 11
TAA-%10 K	127 \pm 7
TAA-%20 K	156 \pm 17

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. ¹TAA-%10K grubuna göre $p < 0.05$, ²TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarına göre $p < 0.05$.



Şekil 20. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyinin gruplara göre karşılaştırılması

4.11. Grupların histopatolojik değerlendirilmesi

Sıçan gruplarının histopatolojik değerlendirilmesinde, kontrol grupları arasında anlamlı farklılaşma gözlenmedi. Bu gruplarda histopatolojik olarak karaciğer nekrozu saptanmadı. TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K grupları arasında da anlamlı farklılaşma gözlenmedi. TAA verilen grupların (TAA-%10K grubunda 4 ve 9 nolu sıçanlar hariç) hepsinde histopatolojik olarak anlamlı düzeyde karaciğer nekrozu olduğu gözlemlendi. TAA-%10K grubunda 4 ve 9 nolu ratlarda histopatolojik olarak karaciğer nekrozu gözlenmedi. Grupların histopatolojik değerlendirme sonuçları Tablo 19’da gösterilmiştir.

Gruplar	Karaciğer histolosi (derecelendirme)
Normal kontrol	0 (0-0)
%10 K-Kontrol	0 (0-0)
%20 K-Kontrol	0 (0-0)
TAA	2,5 (2-3) ¹
TAA-%10 K	2,5 (0-3) ¹
TAA-%20 K	3 (2-3) ¹

Veriler, ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. ¹NK, %10K ve %20K gruplarına göre p< 0.05.

5. TARTIŞMA

Fulminan karaciğer yetmezliği, akut hepatitin ciddi bir komplikasyonudur. Masif karaciğer hücre nekrozu ve ansefalopati ile karakterizedir ve yüksek mortalite oranı ile birlikte (54). Fulminan karaciğer yetmezliğinde etkinliği kanıtlanmış tek tedavi yöntemi acil karaciğer transplantasyonudur (55). Bugüne kadar akut karaciğer yetmezliğinin tedavisinde deneysel olarak, antioksidan, NF-κB ve iNOS aktivasyonunu inhibe eden, anti-inflamatuvar ve serum endotoksin düzeyini azaltmayı amaçlayan pekçok ilaç denenmiştir (7, 8, 9, 10). Fakat medikal tedavilerin etkinliği sınırlıdır ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmamızda, TAA'ye bağlı karaciğer lezyonunda kefirin etkisini test etmek amacı ile rastgele örnekleme yöntemiyle 48 sıçan alınarak, üç adet altı ve üç adet onlu toplam 6 grup oluşturuldu. Ayrıca, 30 sıçanda sürvi tayini yapıldı. Sürvi tayini yapılan sıçan grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Çalışma sonucunda, karaciğer fonksiyon testleri ve karaciğer histopatolojisi değerlendirildiğinde i.p. olarak 350mg/kg-sıçan dozunda TAA verilen gruplarda akut hepatit geliştiği gözlemlendi. Kontrol gruplarında karaciğer enzim düzeyleri normaldi ve histopatolojik olarak nekroz saptanmadı. Ancak TAA verilen sıçanlarda hepatoselüler nekrozu gösteren karaciğer enzimleri yüksek saptandı. Yine TAA alan gruplarda, kontrol gruplarına kıyasla histopatolojik olarak anlamlı düzeyde nekroz saptandı. Bununla birlikte TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında, TAA verilen gruba oranla karaciğer enzim düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde yüksek saptandı. Non-enzimatik antioksidan olan glutatyon düzeyi % 20K grubunda diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. TAA-%10K grubunda ise diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı. Bu bulgu ilaç hepatotoksitesisi ve viral hepatit gibi çeşitli etyolojik sebeplerle gelişen AKY'nin patogeneğinde suçlanan glutatyon depleksiyonunu destekler niteliktedir. (3, 4, 5). Fakat kefirin TAA alan gruplarda glutatyon üzerine etkisi olmadığını saptadık.

Karaciğer enzim düzeyleri ve karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri değerlendirildiğinde, kefirin beklediğimiz anti-oksidan etkisini görmediğimiz gibi, aksine kefirin AKY'de daha zararlı olduğunu gördük. Bunda çeşitli faktörler etkili olabilir. Bilindiği gibi AKY'de hepatic ensefalopati gelişmesini önlemek için, hastalara protein kısıtlaması yapılmaktadır (55, 56, 57). Kefir, bir süt ürünü olması nedeniyle içerdiği protein miktarı AKY'de zararlı olmuş olabilir. Bundan hareketle

antioksidan özelliği olduğu bilinen kefirin, AKY’de protein yükü oluşturmayacak bir dozda kullanılması gerekebilir. Bizim çalışmamızda, deneysel AKY’de kefir ilk kez kullanılmış olduğundan henüz standart bir kefir dozu bulunmamaktadır. Ayrıca deneysel AKY’de kefirin hangi sürede verileceği tam olarak bilinmemektedir.

TAA’in hepatic lezyon yapıcı başlıca mekanizmalarından biri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve doku antioksidan düzeylerinin değişerek oksidatif stresin artmasıdır (6, 7, 8) TAA’e bağlı fulminan karaciğer yetmezliğinde, hidroksil radikal temizleyici dimetilsülfoksit ve dimetiltiyöre’nin (7) güçlü bir serbest radikal temizleyici olan melatonin’in (9), bir antioksidan olan curcumin’in (10) sürviyi iyileştirirken, oksidatif stresi, hepatoselüler yıkımı ve hepatic nekroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, curcumin’in, NF-κB bağlanmasını ve iNOS ekspresyonunu azalttığı da saptanarak, sıçan TAA-karaciğer yetmezliği modelinde, reaktif oksijen radikalleri yanı sıra, NF-κB ve iNOS’un karaciğer yıkımında aracı olduğu ileri sürülmüştür (10). Başka bir sıçan fulminan karaciğer yetmezliği modelinde ise, bir antioksidan ve NF-κB aktivasyon inhibitörü olan pirolidin ditiyokarbamat’ın (PDTC) karaciğer haraplanmasını azalttığı ve sürviyi iyileştirdiği gösterilmiştir (8). Bizim çalışmamızda ise enzimatik anti-oksidan maddeler olan katalaz, SOD ve GPX düzeylerine bakıldı. Bilindiği gibi, SOD enzimi $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 ’ye dönüştürerek ortadan kaldırırken, GPX ve katalaz enzimleri ise H_2O_2 ’yi H_2O ’ya dönüştürerek temizleyen antioksidan enzim sistemleridir. Ortamda $O_2^{\cdot-}$ radikalinin artması SOD enzim aktivitesini, H_2O_2 ’in artmış olması GPX ve katalaz enzim aktivitesini dolaylı olarak arttırmaktadır. Bu çalışmamızda karaciğer dokusunda katalaz düzeylerinde, TAA grubunda diğer kontrol gruplarına oranla yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Katalaz düzeyi kefir verilen gruplarda daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlendi. Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri, kontrol gruplarına oranla TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı. SOD düzeyleri karşılaştırıldığında, kefirin TAA alan tüm gruplarda oksidatif stres üzerine beklediğimiz etkisinin olmadığı gözlemlendi. Katalaz ve SOD değerlerine bakıldığında, kefirin beklenen koruyucu etkisinin aksine AKY’de zararlı olabileceği söylenebilir. Bu bulgu daha önce yapılan bir çalışmada, sıçanlarda düşük doz tiyoasetamid (TAA) enjeksiyonu ile oluşturulan minimal hepatic ensefalopatide probiyotik bakterilerin yararlı bulunması ile uyumlu değildir (2). Çünkü söz konusu çalışmada probiyotik bakteriler minimal hepatic ensefalopatide kullanılmıştır. Ayrıca

probiyotik bakteriler izole edilerek verilmiştir. Başka bir çalışmada ise, kronik hepatik ansefalopatide probiyotiklerin terapötik katkısı gösterilmiştir (1). Ancak akut karaciğer yetmezliğinde probiyotikler denenmemiştir. Kefir ise TAA hepatitinde daha önce kullanılmamıştır ve içerdiği bakterilerin izole edilmeden verilmiş olması beklediğimiz etkinin oluşmamasına neden olabilir. Ayrıca kullandığımız kefirin içindeki laktobasillerin, antioksidan özellik gösteren türleri içerip içermediğini kesin bilmemekteyiz.

Katalaz ve SOD değerlerinin aksine olarak karaciğer dokusunda GPX düzeyi NK grubunda, TAA-%10K grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı. Yine GPX düzeyi, %10K ve %20K gruplarında TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarına oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük olarak saptandı. Bu sonucun katalaz ve SOD enzimlerinden farklı çıkması, GPX enziminin, aynı zamanda bir antioksidan madde olan selenyumu içermesine bağlı olabilir.

Yapılan bir çalışmada probiyotiklerin hepatik ansefalopati patogenezini etkileyebilecek çeşitli etki mekanizmalarına sahip olduğu ve geleneksel tedaviye üstün olabileceği saptanmıştır (1). Başka bir klinik çalışmada 55 kronik hepatik ansefalopatili karaciğer sirozu hastasına 4 hafta süreyle standard tedavi ve *Enterococcus faecium* M-74 ile birlikte selenyum verildiğinde, portal sistemik ansefalopati indeksinin anlamlı olarak düzeldiği, asterikslerin kaybolduğu, kan amonyak düzeyleri ve sayı tamamlama testinin 8-9 haftada normal paterne döndüğü gözlenmiştir (17). Çalışmamızda karaciğer dokusunda MDA düzeyi, %20K grubunda TAA-%10K grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Yapılan bazı çalışmalarda kefirin antioksidan özelliği gösterilmiştir (19, 20) Farelerde oluşturulan karbon tetraklorür toksisitesinde kefirin antioksidan parametreleri olumlu yönde etkilediği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (21). Fakat bizim yaptığımız çalışmada kefirin, lipid peroksidasyonun bir belirteci olan MDA seviyelerini olumlu yönde etkilemediği gözlemlendi.

Bilindiği gibi MPO nötrofil infiltrasyonunun bir belirtecidir. Serbest radikaller dokulara olan doğrudan hasar yapıcı etkilerine ilaveten, lökositlerin hasarlı dokuya toplanmasını sağlayarak doku hasarının aktive nötrofiller üzerinden daha da kötüleşmesine neden olurlar (101). Fagositik lökositler uygun şekilde uyarıldıkları zaman oksijen tüketimlerini artırır. Buna nötrofillerin respiratuvar/oksidatif

patlaması denir. Aktive nötrofiller MPO, elastaz, proteaz gibi bazı enzimler salgılar ve oksijen radikalleri açığa çıkarırlar (102). MPO nötrofillerin oksidan üretiminde baş rol oynar. Peran ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada probiyotiklerin deneysel kolit oluşturulmuş ratlarda MPO seviyelerini azalttığı saptanmıştır (103). Yaptığımız bu çalışmada MPO düzeyleri TAA-%10K grubunda, %10K grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. TAA-%20K grubunda ise kontrol gruplarına oranla anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılaşma saptanmadı. Sonuç olarak bizim çalışmamızda kefirin, TAA verilen ratlarda MPO düzeylerini düşürmediğini saptadık.

Probiyotikler, doğal ve kazanılmış immün yanıtı düzenlemede etkili olabilirler. Probiyotik bakteriler *Escherichia coli* ve laktobasillerin monosit popülasyonlarını ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu azalttığı ve antiinflamatuvar IL-10 yapımını artırdığı gösterilmiştir (22). *Lactobacillus rhamnosus GG*'nin, "*lipopolisakkarid-stimulated macrophage*" TNF-alfa yapımını inhibe ettiği saptanmıştır (23). Yeni bir çalışmada kefirin, farelerde Th2 yanıtını daha güçlü olarak uyardığı ve Th1 yanıtının kontrol edildiği bildirilmiştir (24). Probiyotik bakterilerin ve DNA'larının, TNF-alfa'ya yanıtta, nükleer transkripsiyon- κ B yolağını inhibe ettiği gözlenmiştir (25). Komensal anaerobik barsak bakterilerinin, "*peroxisome proliferator activated receptor-gamma*"nın aktivasyonu yoluyla NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (26). Probiyotiklerin, TNF'nin uyardığı proapoptotik p38/mitogen-activated protein kinase'ın aktivasyonunu azaltmak suretiyle sitokinlerin uyardığı apoptozu inhibe ettikleri de bulunmuştur (27). Bizim çalışmamızda karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında düşük düzeyde olmalarına rağmen, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri, %10K ve %20K gruplarına oranla TAA, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük olarak saptandı. Yine NK grubuna oranla TAA-%10K grubunda IL-10 düzeyi anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük saptandı.

6. SONUÇ

Çalışmamızda i.p. olarak 350mg/kg/sıçan dozunda TAA verilen tüm gruplarda hem biyokimyasal analizlerde hem de histopatolojik olarak akut hepatit geliştiği gözlemlendi. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyi, %20K grubunda diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksek saptandı. TAA-%10K grubunda ise diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde düşük saptandı.

Karaciğer dokusunda katalaz düzeylerinde, TAA grubunda kontrol gruplarına oranla yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Karaciğer dokusunda SOD düzeyleri TAA alan tüm gruplarda, kontrol gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşük saptandı. Fakat GPX düzeyleri TAA alan gruplara oranla kontrol gruplarında anlamlı düzeyde düşük saptandı.

Karaciğer dokusunda MDA düzeyi, %20K grubunda TAA-%10K grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

MPO düzeyleri TAA-%10K grubunda, %10K grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek saptandı. TAA-%20K grubunda ise NK, %10K ve %20K grupların oranla anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılaşma saptanmadı.

Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri, TAA-%10K ve TAA-%20K gruplarında düşük düzeyde olmalarına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri ise TAA alan gruplarda, kontrol gruplarına oranla düşük saptandı.

Bütün bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, TAA ile oluşturulan AKY'de, daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan özelliği bilinen kefirin koruyucu etkisinin olmadığı, aksine zararlı olabileceği gözlemlendi. Bu sonucun karklı nedenleri olabilir. Kefirin, standart bir doz uygulaması henüz netlik kazanmamıştır. Çalışmamızda kefir % 10 ve % 20'lik dozlarda verildi. Dolayısıyla AKY modelinde kefirin hangi süre ve dozda kullanılacağı tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca bizim kullandığımız kefirin içindeki laktobasillerin, antioksidan özellik gösteren türleri içerip içermediğini kesin bilmemekteyiz. Sıçanlara verdiğimiz kefirin, AKY'de

protein yükü oluşturabileceği de bir başka faktör olabilir. Bu nedenle AKY tedavisinde kullanılacak ve ilaçlara bağlı gelişen hepatotoksisiteyi önleyecek ve/veya azaltacak yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

SIÇANLARDA TİYOASETAMİD İLE UYARILAN AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİNİ ÖNLEMEDE KEFİRİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Fulminan karaciğer yetmezliği, akut hepatitin ciddi bir komplikasyonudur. Masif karaciğer hücre nekrozu ve ansefalopati ile karakterizedir ve yüksek mortalite oranı ile birlikte dir. Etkinliği kanıtlanmış tek tedavi yöntemi acil karaciğer transplantasyonudur. Bugüne kadar pek çok ilaç denenmiş, fakat bütün bu medikal tedavilerin etkinliği sınırlıdır ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmamızda tam doz TAA'ya bağlı AKY'de kefirin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık. Deneye 48 sıçan alınarak, üç adet altılı ve üç adet onlu toplam 6 grup oluşturuldu. Ayrıca, 30 sıçanda sürvi tayini yapıldı. Hepatotoksik ajan olarak i.p. olarak 350mg/kg/sıçan dozunda TAA kullanıldı. Sakrifiye edilen sıçanlarda karaciğer fonksiyon testleri, doku düzeyinde GSH, katalaz, GPX, SOD, MPO, MDA, TNF- α , IL-10 gibi biyokimyasal parametreleri değerlendirdik. Ayrıca histopatolojik değerlendirmede hepatoselüler nekroz derecesine bakıldı.

Çalışma sonucunda, karaciğer histopatolojisi değerlendirildiğinde TAA verilen gruplarda akut hepatit geliştiği gözlemlendi. Ancak TAA alan gruplar arasında histopatolojik olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bununla birlikte kefir verilen gruplarda transaminaz düzeyleri, PT ve INR değerleri daha yüksek saptandı. Ayrıca antioksidan özelliği olan glutatyon düzeyleri kefir verilen gruplarda düşük saptandı. Sonuç olarak AKY'de kefirin etkinliğinin aksine zararlı olabileceğini saptadık.

Anahtar kelimeler: Kefir, Akut Karaciğer Yetmezliği, oksidatif stres, thioacetamide bağlı hepatotoksisite.

8. İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE KEFİR ON THE THIOACETAMİDE INDUCED ACUT HEPATIC FAILURE IN RATS

Fulminant hepatic failure (FHF) is a serious complication of acute hepatitis. It is characterized by massive cell necrosis and encephalopathy, and is associated with high mortality. Liver transplantation is the single treatment option. Many drugs have been tried for the treatment, however none of them have been found successful. Therefore, new treatment modalities are needed.

In this study, we aimed to investigate protective effect of kefir on the full dose Thioacetamide (TAA) induced the FHF in rats. Fourty eight rats were divided into six groups, 3 containing 6 rats and other 3 groups were containing 10 rats in each group. Additionally, survey evaluation was done on 30 rats. As a hepatotoxic agent, TAA in 350 mg/kg/rat dose i.p. was used. We analyzed liver function tests and biochemical parameters in liver tissue such as GSH, catalase, GPX, SOD, MPO, MDA, TNF- α and IL-10. In addition, hepatocellular necrosis was investigated with histopathologic examination.

As a result of histopathologic examination, acute hepatitis was developed in all groups which were treated with TAA. However, there was no significant difference between the groups. In addition, in the groups which Kefir were used, transaminases, PT and INR values were higher comparing to those in TAA was used. Glutation, which has antioxidant effect, was lower in kefir groups comparing to those in other groups.

In conclusion, we have found that kefir might be harmful in contrast to our previous hypothesis that kefir can have favorable effects on gastrointestinal system.

Key words: Kefir, Fulminant Hepatic Failure, Oxidative stress, Thioacetamide induced hepatotoxicity

9. KAYNAKLAR

- 1- Solga SF. Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses*. 2003;61:307-13.
- 2- Jia L, Zhang MH. Comparison of probiotics and lactulose in the treatment of minimal hepatic encephalopathy in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 14;11:908-11.
- 3- Slatter JG, Rashed MS, Pearson PG, Han DH, Baillie TA. Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities. *Chem Res Toxicol*. 1991;4:157-61
- 4- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. 1987;1:441-5.)
- 5- Mayer MP, Prestwich GD, Dolence JM, Bond PD, Wu HY, Poulter CD. Protein farnesyltransferase: production in *Escherichia coli* and immunoaffinity purification of the heterodimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1993. 30;132:41-7.
- 6- Lu SC, Huang ZZ, Yang H, Tsukamoto H. Effect of thioacetamide on the hepatic expression of gamma-glutamylcysteine synthetase subunits in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999. 15;159:161-8.
- 7- Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol*. 1999;31:27-38
- 8- Bruck R, Aeed H, Schey R, Matas Z, Reifen R, Zaiger G, Hochman A, Avni Y. Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J Hepatol*. 2002;36:370-7.
- 9- Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor

- kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol.* 2004;40:86-93.
- 10- Shapiro H, Ashkenazi M, Weizman N, Shahmurov M, Aeed H, Bruck R. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21:358-66.
 - 11- Wang CH, Jawan B, Lee TH, Hung KS, Chou WY, Lu CN, Liu JK, Chen YJ. Single injection of naked plasmid encoding alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 10;322:153-61
 - 12- Chu CJ, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Wu SL, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:156-63.
 - 13- Rahman TM, Hodgson HJ. The effects of early and late administration of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in a thioacetamide-induced model of acute hepatic failure in the rat. *J Hepatol.* 2003;38:583-90.
 - 14- 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.
 - 15- Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology.* 1993;18:576-80.
 - 16- Chu CJ, Chen CT, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Wu SL, Lu RH, Chan CC, Huang HC, Lee SD. Hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 2001;64:321-30.
 - 17- Boca M, Vyskocil M, Mikulecký M, Ebringer L, Kolibás E, Kratochvíl'ová H, Buzgová D. [Complex therapy of chronic hepatic encephalopathy supplemented with probiotic: comparison of two studies] *Cas Lek Cesk.* 2004;143:324-8.

- 18- Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2004;39:1441-9
- 19- Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci*. 2000;45:1617-22
- 20- Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc*. 2001;101:229-38; quiz 239-41.
- 21- 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. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003;50:412-6.
- 22- Haller D, Serrant P, Peruisseau G, Bode C, Hammes WP, Schiffrin E, Blum S. IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *Microbiol Immunol*. 2002;46:195-205.
- 23- Peña JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol*. 2003;5:277-85.
- 24- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigón G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res*. 2005;72:195-202
- 25- Madsen K. Combining T cells and IL-10: a new therapy for Crohn's disease? *Gastroenterology*. 2002;123:1877-88.
- 26- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nat Immunol*. 2004;5:104-12.
- 27- Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:27-277
- 28- Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune M, Speelmans G, Knol J, Jacobs JA, Dejong CH, Vriesema AJ, Greve JW. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. *Infect Immun*. 2005;73:3686-92.
- 29- Marotta F, Barreto R, Wu CC, Naito Y, Gelosa F, Lorenzetti A, Yoshioka M, Fesce E. Experimental acute alcohol pancreatitis-related liver damage

- and endotoxemia: synbiotics but not metronidazole have a protective effect. *Chin J Dig Dis.* 2005;6:193-7.
- 30- Urao M, et al. Fujimoto T, Lane GJ, Seo G, Miyano T. Does probiotics administration decrease serum endotoxin levels in infants? *J Pediatr Surg.* 1999;34:273-6.
- 31- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol.* 2005 7;11(33):5185-92.
- 32- Lamine F, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L, Theodorou V. Colonic responses to *Lactobacillus farciminis* treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:1250-8.
- 33- Marteau P. Living drugs for gastrointestinal diseases: the case for probiotics. *Dig Dis.* 2006;24:137-47.
- 34- Metchnikoff E. The prolongation of life. New York & London. Putnam's Sons.
- 35- Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci.* 1998;81:2336-40.
- 36- Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J.* 2004;80:516-26.
- 37- Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr.* 1974;27:464-9.
- 38- 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.
- 39- Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:506-12.
- 40- 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.

- 41- Marshall VM. Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. *J Dairy Res.* 1987;54(4):559-74.
- 42- Turan İlker, İlter Tankut . Kafkas Dağlarından Günümüze: Kefir. *Güncel Gastroenteroloji*, Haziran 2007; 65-75
- 43- Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth ER. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol.* 2006;29:59-68.
- 44- Toba T, Arihara K, Adachi S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *Int J Food Microbiol.* 1990;10:219-24.
- 45- Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* 2005;53:2467-74.
- 46- Libudzisz Z and Piatkiewicz A. Kefir production in Poland. *Dairy Ind. Inter.* 1990; 55;31-3
- 47- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdígón G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res.* 2005;72:195-202.
- 48- Zacconi C, Parisı MG, Sara PG, Dallavalle P, Bottazzi V. Competitive exclusion of salmonella kedougou in kefir fed chicks. *Microbiol Alim Nutr* 1995;12:387-90
- 49- Angulo L, Lopez E, Lema C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain). *J Dairy Res.* 1993;60(2):263-7.
- 50- Farnworth ER, Mainville I. 2003. Kefir: A fermented milk product. *Handbook of fermented functional foods.* 2003; 77-111.
- 51- Stecchini ML, Del Torre and Munari M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria. *Int J Microbiol.* 2000; 64: 183-88.
- 52- Knauf HJ, Vogel RF, Hammes WP. Cloning, sequence, and phenotypic expression of katA, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:832-9.
- 53- İdilman R. Akut karaciğer yetmezliği. *Viral Hepatit 2007 2. Baskı. Viral Hepatitle Savaşım Derneği.* İst. 2007;338-45
- 54- Lee WM. Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis* 2003; 23:217-26
- 55- Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med.* 1993 16;329(25):1862-72.

- 56- Çakaloğlu Y. Akut karaciğer yetmezliği (Hepatik Ensefalopati). Gastroenterohepatoloji. Ökten A (editör). Nobel Tıp Kitabevleri, 2001, 417-432.
- 57- Yee HF, Lidofsky SD. Acute liver failure. In: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease. 7th Edition. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (eds). Saunders, 2002, 1567-77.
- 58- Çakaloğlu Y. İlaça Bağlı Hepatobiliyer Hastalıklar. Gastroenterohepatoloji. Ökten A (editör). Nobel Tıp Kitabevleri, 2001, 487-513.
- 59- Zimmerman HJ, Maddrey WC. Toxic and drug-induced hepatitis, Diseases of the liver, 7th ed. Philadelphia: JB Lippincott.
- 60- Mitchel JR, Nelson SD, Thorgeirson SS, et al. Metabolic activation: biochemical basis for many drug-induced liver injuries. Prog Liver Dis 1976;5:259.
- 61- Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease. Clin Liver Dis. 2000;4:73-96.
- 62- Kaplowitz N, Aw TY, Simon FR, Stolz A. Drug-induced Hepatotoxicity. Ann Intern Med 1986;104:826
- 63- Nathan M. Bass, MD, PhD. Çeviri: Dr. Nur Arslan, Dr. Benal Büyükgebiz. İlaça Bağlı Karaciğer Hastalığı, Current Gastroenteroloji. 2007; 664
- 64- Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. New York: Appleton-Century Crofts, 1978.
- 65- Menteş, N.K.: Klinik Gastroenteroloji. İnsanda Çevresel Faktörlerin Husule Getirdiği Karaciğer Bozuklukları veya Lezyonları, Kimyasal Hepatit, Cilt 2. 4. Baskı, Ege Üniv. Tıp Fak. Yayını, 598-611, 1983.
- 66- Reed DJ. Status of calcium and thiols in hepatocellular injury by oxidative stres. Semin Liver Dis 1990;10:285.
- 67- Zimmerman HJ, Lewis JH. Drug-inuced cholestasis. Med Toxicol 1987; 2:112.
- 68- Chen CT, Chu CJ, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Chan CC, Wang SS, Huang HC, Lee SD. Evidence against a role for endotoxin in the hepatic encephalopathy of rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. J Gastroenterol Hepatol 2005;20:450-5.
- 69- Pawa S, Ali S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. Biochim Biophys Acta 2004;1688:210-22.

- 70- Sun F, Hayami S, Ogiri Y, et al. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:181-5.
- 71- Thomas MJ: The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Critical Rev. Food. Sci. Nutrit.* 1995; 35: 21-39.
- 72- Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 479-481.
- 73- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Rev. Food. Sci. And Nutrit.* 1995; 35: 7-20.
- 74- Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Lab. Invest.* 1982; 4: 412-426.
- 75- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet.* 1984.10;2(8411):1095.
- 76- Reilly PM, Schiller, IJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991; 161: 488-503.
- 77- Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery.* 1983; 94: 407-411.
- 78- Parks DA. Oxygen radicals: mediator of gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology.* 1989; 30: 293-298.
- 79- Özyurt H. Deneysel olarak bleomisin ile sıçan akciğerinde oluşturulan fibroziste serbest radikallerin rolü ve fibrozis oluşturan mekanizmalar üzerine kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) etkisi. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, 2002.
- 80- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia.* 2002; 73: 53-63.
- 81- Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21: 24-28.
- 82- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları, Konya.* 1995; 1-132.

- 83- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222:1-15.
- 84- Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D., 1994.
- 85- Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-89.
- 86- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003; 189: 41-54.
- 87- Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
- 88- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 1986; 77: 319-321.
- 89- McCord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- 90- Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-592.
- 91- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. *Cellular and Molecular Immunology*, 5th. Ed. Saunders, 243-275, 2003
- 92- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kuppfer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-61
- 93- Laskin DL. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* 1990;10:293-304
- 94- Olynyk JK, Matuschack GM, Lechner AJ, et al. Differential production of TNF by Kuppfer cells after phagocytosis of *E. coli* and *C. albicans*. *Am J Physiol* 1994;267:213-19
- 95- Tran-thi T-A, Weinhold L, Weinstock C, et al. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in the perfused rat liver. *Eur Cytokine Netw* 1993;4:363-70
- 96- Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 1994;368:339-42

- 97- Leist M, Gantner F, Bahlinger I, et al. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF- α requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994;153:1778-88.
- 98- 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; 272:809-14.
- 99- Fadeel B, Orrelius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479-517
- 100- Oliver JR, Jiang S, Cherian MG. Augmented hepatic injury followed by impaired regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after treatment with thioacetamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006. 1;210:190-9.
- 101- Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004;24, 469-473.
- 102- Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 2000;67, 591-602.
- 103- Peran L, Camuesco D, Comalada M. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21: 737-746