



Probiyotiklerin irinotekan ilişkili karaciğer yağlanması karşı koruyucu etkisinin araştırılması: Hayvan deneyi modeli

Investigation of the protective effect of probiotics against irinotecan-induced fatty liver disease: An experimental animal model

● Serhat OCAKLI¹, ● Gökhan AKKURT², ● Bahar KARTAL³, ● Burcu AKKURT⁴,
● İbrahim DOĞAN⁵, ● Erdiç ÇETİNKAYA⁵, ● Bülent Cavit YÜKSEL⁵

Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi, ²Cerrahi Onkoloji Kliniği, ⁵Genel Cerrahi Kliniği, Ankara

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, ³Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi, ⁴Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET • Giriş ve Amaç: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, küresel nüfusun yaklaşık %25'ini etkileyen ve irinotekan kullanan hastaların %20'sinde ilaca bağlı olarak gelişen kronik bir hastalıktır. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tedavisi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, diyet değişikliği ve egzersiz üstün, standart bir tedavi yöntemi henüz keşfedilememiştir. Probiyotiklerin, diyetle ilişkili yağlı karaciğer hastalığı üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, metastatik kolon-rektum, mide ve pankreas tümörlerinin sistemik tedavi rejimlerinde sıklıkla yer alan irinotekanın neden olduğu non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının, probiyotiklerin eşzamanlı kullanımıyla önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçlamaktadır. **Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma, hayvan deneyi modeli olarak planlandı ve sekizer fareden oluşan dört grup (normal salin, sadece irinotekan, irinotekan + probiyotik ve yalnız probiyotik) oluşturuldu. Yedi haftalık sürenin sonunda, probiyotik kullanımının etkisi biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal analizlerle incelendi. **Bulgular:** Yapılan incelemeler sonucunda, irinotekan + probiyotik grubunda, sadece irinotekan alan gruba kıyasla steatoz, lobüler inflamasyon, hepatosit balonlaşması, fibrozis, indüklenbilir nitrik oksit sentaz düzeyi, dönüştürücü büyüme faktörü-beta düzeyi ve aspartat aminotransferaz düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme gözlemlendi ($p < 0.05$). **Sonuç:** Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, irinotekan ile birlikte probiyotik kullanımının, yağlı karaciğer hastalığı ve steatohepatitin gelişimini azaltabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, irinotekan, probiyotik

ABSTRACT • Background and Aims: Non-alcoholic fatty liver disease is a chronic condition that affects approximately 25% of the global population and develops in 20% of patients using irinotecan. Although many studies have been conducted on the treatment of non-alcoholic fatty liver disease, a standard treatment method superior to diet modification and exercise has not been discovered yet. It has been shown that the use of probiotics has positive effects on diet-related fatty liver disease. This study aimed to investigate whether non-alcoholic fatty liver disease caused by irinotecan, which is frequently included in the systemic treatment regimens of metastatic colon-rectum, stomach, and pancreatic tumors, can be prevented through the concomitant use of probiotics. **Material and Methods:** In this study, which was planned as an experimental animal model, four groups of eight mice each (normal saline, irinotecan alone, irinotecan + probiotics, and probiotics alone) were formed, and at the end of the seven-week period, the effect of probiotic use was examined using biochemical, histological, and immunohistochemical analyses. **Results:** As a result of the examinations, a statistically significant improvement was observed in the irinotecan + probiotics group in terms of steatosis, lobular inflammation, hepatocyte ballooning, fibrosis, inducible nitric oxide synthase level, transforming growth factor beta level, and aspartate aminotransferase level compared to the group receiving irinotecan alone ($p < 0.05$). **Conclusion:** The results obtained from this study suggest that the concomitant use of probiotics with irinotecan may reduce the development of fatty liver disease and steatohepatitis.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease, irinotecan, probiotics

GİRİŞ

Karaciğer yağlanması, karaciğer dokusunda %5'ten fazla oranda yağ bulunması olarak tanımlanır. Sebebe göre sınıflandırılan bu hastalık, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve alkolik yağlı karaciğer hastalığı olarak ikiye ayrılır. Dünya nüfusunun yaklaşık %25'inde görülen (1) NAFLD ise kendi içinde non-alkolik yağlı karaciğer [(NAFL) non-alcoholic fatty liver] ve non-alkolik steatohepatit (NASH) olarak iki alt gruba ayrılır. NAFLD'nin başlıca sorumlusu diyetdir. Obezite ve insülin direnci önemli risk faktörleri arasında yer alır. Diyet dışında bir sebep olan ve son yıllarda ayrı bir konu olarak değerlendirilen kemoterapi ilişkili steatohepatit (CASH), daha çok irinotekan (IRI), 5-florourasil (5-FU), metotreksat gibi antitümöral ajanların kullanımı sonucu ortaya çıkan klinik bir durumdur.

Bir kemoterapötik ajan olan IRI, özellikle metastatik kolon-rektum, mide ve pankreas kanseri tedavisinde FOLFIRI (folinik asit + 5-FU + IRI) ve FOLFOXIRI (folinik asit + 5-FU + oksaliplatin + IRI) gibi protokollerin içinde yer alır ve sık olarak uygulanır. Literatürde IRI kullanan kolon kanserli hastalarda %20'ye varan oranlarda karaciğer yağlanması geliştiğini ve sonrasında yapılan karaciğer cerrahilerinde 90 günlük mortalitenin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (2). Kemoterapi kesildikten yaklaşık 9 ay sonra bu olumsuz etkiler geriliyor olsa da rezeksiyon planlanan hastalarda bu kadar uzun süre tedavisiz olarak beklemek ayrıca sorun teşkil etmektedir (3).

Dünya Sağlık Örgütü probiyotikleri, yeterli miktarda tüketildiğinde konağa fayda sağlayan mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadır. Lakto-basiller, Bifidobakteriler ve Sakkaromiçesler en yaygın kullanılan probiyotiklerdir (4).

Yapılan çalışmalar bağırsak florasının yalnızca gastrointestinal sistemdeki değil, vücuttaki diğer pek çok sistemdeki fizyoloji ve patolojilerle iliş-

kisinin olduğunu göstermiştir (5). Diyet ilişkili karaciğer yağlanması üzerine yapılan hayvan deneylerinde probiyotik kullanımının diyet ilişkili NAFLD'nin etkilerini azalttığı gösterilmiştir (6).

Bu çalışmada amaç; IRI kullanan neredeyse her 5 hastadan birinde görülen ve prognozu olumsuz yönde etkileyen CASH'nin, diyet ilişkili NAFLD'ye karşı etkili olan oral probiyotik kullanımı gibi basit bir yöntemle önlenip önlenemeyeceğinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney protokolü, hayvan etik kurulunca onaylanmış olup (30.06.2020 tarih ve onay numarası: 497) bu çalışmada, Guinea Pig Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen 32 erkek CD-1 fare kullanıldı. Hayvanlar kontrollü bir ortamda tutuldu (sirkadiyen döngü, 25 °C, yiyecek ve su ad libitum olarak sağlandı). Tüm süreç Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prensiplerine uygun olarak yönetildi.

İrinotekan hidroklorür trihidrat (İrinocam®, Koçak Farma, İstanbul, Türkiye, 100 mg flakon) ve steril salin kullanıldı. Otuz iki hayvan, her birinde sekizer fare olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Grup I (kontrol) farelerine haftada üç kez yalnız salin (5 mL/kg, ip), Grup II (IRI) farelere haftada üç kez IRI (50 mg/kg, ip) enjekte edildi, Grup III (IRI + probiyotik) farelere haftada üç kez IRI (50 mg/kg, ip) ve her gün gavaj yoluyla 2×10^9 cfu probiyotik (*Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*) verildi, Grup IV (yalnız probiyotik) farelere ise her gün gavaj yoluyla 2×10^9 cfu probiyotik (*Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*) verildi. Kullanılan dozlar daha önce yayınlanmış çalışmalara göre belirlendi (7). Uygulamalara 7 hafta boyunca kesintisiz devam edildi. Tüm hayvanlardan deneyin başında ve sakrifikasyondan hemen önce kan örnekleri alındı. Albümin, alanin ve aspartat aminotransferazların (ALT ve AST) plazma konsantrasyonları ölçüldü.

Sakrifikasyon sonrası tümüyle çıkarılan karaciğer dokuları %10 nötr formalin içinde fikse edildi, kurutuldu ve parafine gömüldü. Daha sonra parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alındı. Rutin histolojik prosedürden sonra lamalar Hematoksisilen-Eozin (H&E) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (x100) incelendi. Tanı konuldu ve NASH, daha önce tarif edildiği gibi alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru (NAS) kullanılarak derecelendirildi (8). Parankimin değerlendirilmesi kısaca şu şekildedir:

- Steatoz (< 5% = grade 0; %5 – 33 = grade 1; %33 – 66 = grade 2; > 66% = grade 3);
- Lobüler inflamasyon (200 × alan başına infiltrat yok = grade 0; 2 infiltrata kadar = grade 1; 2 - 4 infiltrat = grade 2; > 4 infiltrat = grade 3)
- Hepatositlerde balonlaşma (0 = yok; 1 = hafif; 2 = şiddetli)

NASH'i doğrulamak için bu üç parametrenin uyuşması gereklidir. Portal inflamatuvar infiltrasyon şu şekilde derecelendirildi:

- Grade 0 = hiç-minimal;
- Grade 1 = minimumdan büyük

Fibrozis düzeyi ise şu şekilde derecelendirildi:

- Grade 0 = yok;
- Grade 1 = perisinüzoidal veya periportal fibrozis;
- Grade 2 = perisinüzoidal ve periportal fibrozis;
- Grade 3 = köprüleşme fibrozisi;
- Grade 4 = siroz.

İmmünohistokimyasal boyamalar indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) gerçekleştirildi. Karaciğer kesitleri (5 µm) deparafinize edildi. Ksilen ve dereceli alkollerle yeniden hidratlandırıldı. Antijen alımı 96 °C'de (10 mM/L sitrat tamponu, pH: 6) mikrodalgada 10 dakika süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra endojen peroksidaz (15 dakika) %3 (h/h) hidrojen peroksit ile bloke edildi ve fos-

fat tamponlu salin (Phosphate Buffered Saline, PBS) içinde yıkandı. Slaytlar daha sonra bloke edici serumda bloke edildi (UltraV Block, ScyTek Laboratories, Utah, ABD). Kesitler, primer tavşan anti-iNOS [Anti-iNOS antikoru (SP126) ab115819; PBS içinde 1:100 seyreltilmiş] ve anti-TGF-β [Cat No. GTX21279 TGF-β antikoru (TB21) PBS içinde 1:1000 seyreltilmiş] ile gece boyunca (4 °C) inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyondan sonra, doku kesitleri her seferinde 5 dakika olmak üzere iki kez PBS ile yıkandı ve ardından biyotinlenmiş anti-fare sekonder antikoru (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile üç yıkamadan sonra antijen-antikor kompleksleri, 10 dakika boyunca bir streptavidin-peroksidaz kompleksi (TP-060-HL; LabVision, Fremont, CA, ABD) kullanılarak tespit edildi. Kesitler 3,3'diaminobenzidine ile inkübe edildi ve Mayer hematoksisileni (Merck, ScyTek Laboratories) ile hafifçe zıt boyandı. Son olarak kesitler kurutuldu ve Entellan (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) ile monte edildi. Slaytlar, ışık mikroskobu (LeicaDM4000, Wetzlar, Almanya) altında incelendi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimya değerlendirmesi için H-SCORE analizleri kullanıldı.

Çalışma 32 denek üzerinden gerçekleştirildi. Veriler IBM SPSS Statistics 23 programına aktararak tamamlandı. Çalışma verileri değerlendirilirken sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma) verildi. Gruplar arasında fark olup olmadığına tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile bakıldı. "Tek yönlü varyans analizi" (ANOVA) sonucunda öncelikle varyans homojenliği için Levene testine, ardından farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığı "çoklu karşılaştırma testi" (Bonferroni ya da Tamhane's T2) ile kontrol edildi. Varyans homojenliğini sağlayan değişkenlerde gruplar arasındaki fark incelemesi için Bonferroni, varyans homojenliğini sağlamayan değişkenlerde gruplar

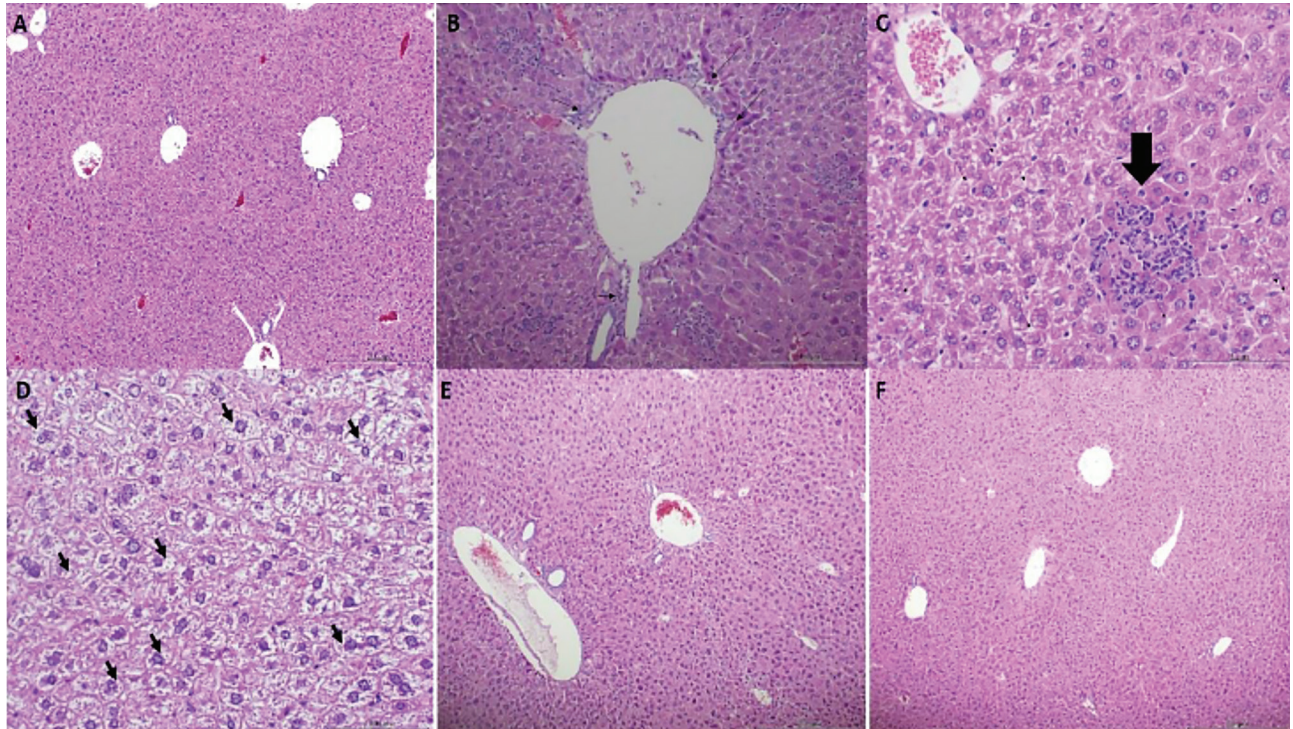
arasında fark incelemesi için Tamhane's T2 testine bakıldı. Ayrıca deney öncesi ve sonrasındaki ölçümler arasındaki farkların incelenmesinde bağımlı örneklem t testinden yararlanıldı. Anlamlılık için $p < 0.05$ alındı.

BULGULAR

Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda, IRI grubunun steatoz skoru diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek tespit edildi. IRI + probiyotik grubunun steatoz skoru ise kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). IRI grubunun lobüler inflamasyon skorunun diğer gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptandı ve bu

skorun IRI + probiyotik grubunda da kontrol grubu ve yalnız probiyotikler grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Hepatosit balonlaşma skorunun IRI grubunda diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü ve bu skor aynı zamanda IRI + probiyotik grubunda da kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla daha yüksek olarak kaydedildi ($p < 0.05$). IRI grubundaki NAS değeri diğer gruplara göre daha yüksek bulundu ve IRI + probiyotik grubunda da kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). IRI grubunun fibrozis skorunun diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 1) (Resim 1).

IRI grubunun iNOS ve TGF- β değerlerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlendi ve



Resim 1 Fare karaciğer dokularının histolojik fotomikrografları. Sadece salin enjeksiyonu yapılan farelerin karaciğer dokusu normal morfolojiye sahip olup sağlam bir yapıyı göstermektedir (A). IRI ile enjeksiyon yapılan farelerde portal inflamasyon (B), lobüler inflamasyon (C) ve mikroveziküler steatoz ile balonlaşma dejenerasyonu (D) gözlemlenmektedir; bunlar steatohepatitte tipik histopatolojik değişikliklerdir. IRI + probiyotik grubunda ise histopatolojik değişiklikler daha azdır (E). Yalnız probiyotik grubundaki farelerin karaciğer dokusu normal histolojik yapıya sahiptir (F). Oklar, yukarıda açıklanan değişiklikleri göstermektedir. H&E boyama (A, B, E, ve F: 100 × büyütme; C ve D: 40 × büyütme).

Tablo 1 Gruplar arasındaki histolojik ve immünohistokimyasal farklılıkların incelenmesi

		Ortalama	Std. Sapma	F	p	Fark
Steatozis	1. Kontrol	0.00	0.00	281.906	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	2.03	0.27			
	3. IRI + Probiyotik	1.03	0.07			
	4. Probiyotik	0.10	0.15			
Lobular inflamasyon	1. Kontrol	0.20	0.15	124.568	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	2.43	0.31			
	3. IRI + Probiyotik	1.35	0.30			
	4. Probiyotik	0.38	0.25			
Hepatosit balonlaşma	1. Kontrol	0.18	0.13	57.469	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	1.48	0.21			
	3. IRI + Probiyotik	0.85	0.33			
	4. Probiyotik	0.25	0.18			
NAS Değeri (0-8)	1. Kontrol	0.38	0.23	339.356	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	5.93	0.45			
	3. IRI + Probiyotik	3.23	0.52			
	4. Probiyotik	0.73	0.32			
Fibrozis	1. Kontrol	0.03	0.07	28.374	0.000*	1, 3, 4 < 2
	2. IRI	0.93	0.35			
	3. IRI + Probiyotik	0.28	0.28			
	4. Probiyotik	0.00	0.00			
iNOS	1. Kontrol	6.20	1.31	312.129	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	136.75	14.54			
	3. IRI + Probiyotik	76.50	13.34			
	4. Probiyotik	7.65	3.27			
TGF-β	1. Kontrol	4.53	2.16	194.220	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	137.50	23.07			
	3. IRI + Probiyotik	63.75	10.05			
	4. Probiyotik	7.25	2.11			

F: One-way ANOVA testi*; p < 0.05.

NAS: Alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru; iNOS: İndüklebilir nitrik oksit sentaz; TGF-β: dönüştürücü büyüme faktörü-beta; IRI: İrinotekana;

bu değerler IRI + probiyotik grubunda da kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla daha yüksek olarak ölçüldü (her ikisi için de p < 0.05) (Tablo 1) (Resim 2 ve 3).

IRI grubunun ortalama ALT değeri, kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek kaydedildi, IRI + probiyotik grubunun ALT değeri ise IRI grubuna kıyasla daha düşük, kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla ise daha yüksek saptandı, ancak istatistik-

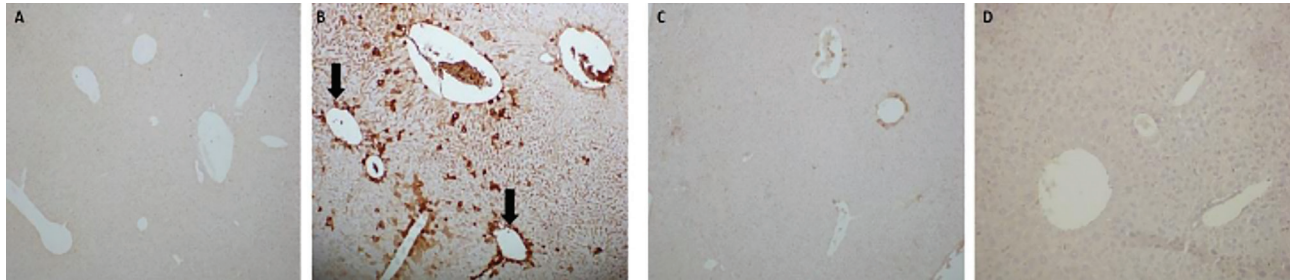
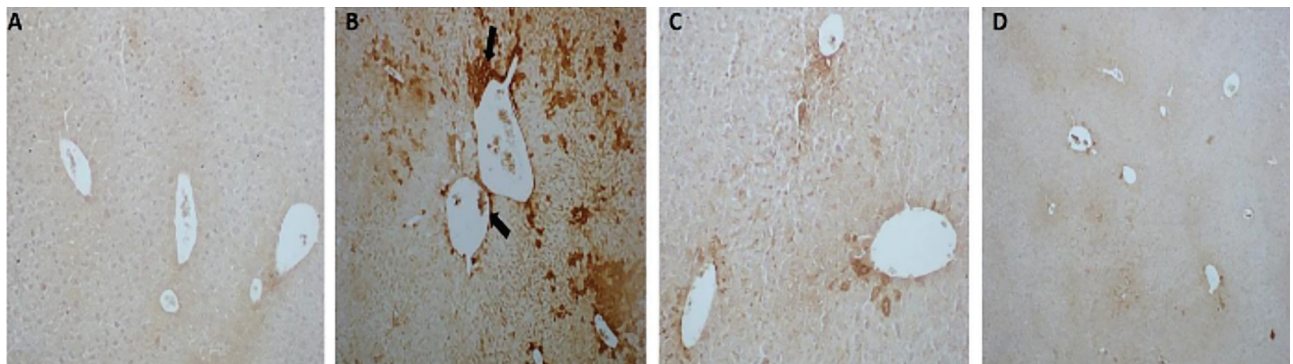
sel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. AST değeri, IRI grubunda diğer gruplardan daha yüksek tespit edildi ve IRI + probiyotik grubunda da kontrol grubu ve yalnız probiyotik grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi (p < 0.05). IRI ve IRI + probiyotik gruplarının albümin düzeyleri, diğer iki gruba kıyasla anlamlı şekilde daha düşük saptandı (p < 0.05). IRI + probiyotik grubunun albümin seviyesi IRI grubuna kıyasla daha yüksek bulunsada, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2).

Tablo 2 Gruplar arasındaki kan parametreleri farklılıkların incelenmesi

		Ortalama	Std. Sapma	F	p	Fark
ALT	1. Kontrol	39.80	12.43	12.814	0.000*	1, 4 < 2
	2. IRI	92.60	28.78			
	3. IRI + Probiyotik	58.40	16.83			
	4. Probiyotik	45.30	11.72			
AST	1. Kontrol	72.60	6.09	174.694	0.000*	1, 4 < 3 < 2
	2. IRI	214.70	26.56			
	3. IRI + Probiyotik	133.00	6.78			
	4. Probiyotik	70.10	7.54			
Albümin	1. Kontrol	40.40	3.01	13.199	0.000*	2, 3 < 1, 4
	2. IRI	33.80	2.65			
	3. IRI + Probiyotik	35.10	1.79			
	4. Probiyotik	38.30	1.60			

F: One-way ANOVA testi*; p < 0.05

ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; IRI: Irinotekan

**Resim 2** Fare karaciğer örneklerinde iNOS immünboyama. Sadece salin enjeksiyonu yapılan grupta boyama gözlemlenmemektedir **(A)**, IRI grubunda yoğun boyama **(B)**, IRI + probiyotik grubunda orta düzeyde boyama **(C)** ve yalnız probiyotik grubunda ise zayıf boyama **(D)** görülmektedir.**Resim 3** Fare karaciğer örneklerinde TGF-β immünboyama. Sadece salin enjeksiyonu yapılan grupta boyama gözlemlenmemektedir **(A)**, IRI grubunda yoğun boyama **(B)**, IRI + probiyotik grubunda orta düzeyde boyama **(C)** ve probiyotik grubunda ise zayıf boyama **(D)** görülmektedir.

Tablo 3 Çalışma öncesi ve sonrası ölçümlerin farklılıkların incelenmesi

		Çalışmaya Başlamadan Önce Bazal Seviye		Çalışma Sonrası		t	p
		Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma		
ALT	Kontrol	46.00	17.95	39.80	12.43	0.822	0.438
	IRI	46.00	17.95	92.60	28.78	-3.873	0.006*
	IRI + Probiyotik	46.00	17.95	58.40	16.83	-2.053	0.079
	Probiyotik	46.00	17.95	45.30	11.72	0.121	0.907
AST	Kontrol	65.20	8.18	72.60	6.09	-1.981	0.088
	IRI	65.20	8.18	214.70	26.56	-17.995	0.000*
	IRI + Probiyotik	65.20	8.18	133.00	6.78	-17.210	0.000*
	Probiyotik	65.20	8.18	70.10	7.54	-1.250	0.252
Albümin	Kontrol	40.20	2.98	40.40	3.01	-0.135	0.896
	IRI	40.20	2.98	33.80	2.65	7.452	0.000*
	IRI + Probiyotik	40.20	2.98	35.10	1.79	7.169	0.000*
	Probiyotik	40.20	2.98	38.30	1.60	1.868	0.104

t: Bağımlı örneklem t testi*; p < 0.05

ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; IRI: İrinotekan.

Deney öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinin analizine göre, kontrol, IRI + probiyotik ve yalnız probiyotik gruplarında deney öncesi ve sonrası ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$); ancak, IRI grubunun ALT değerinin deney sonrası anlamlı şekilde arttığı belirlendi ($p < 0.05$). AST değeri açısından, kontrol ve yalnız probiyotik gruplarının deney öncesi ve sonrası değerlendirmeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$), ancak IRI ve IRI + probiyotik gruplarında anlamlı bir artış kaydedildi ($p < 0.05$). Albümin değerlendirmesi, kontrol ve yalnız probiyotik gruplarında deney öncesi ve sonrası değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunulmazken ($p > 0.05$), IRI ve IRI + probiyotik gruplarında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo 3).

TARTIŞMA

NAFLD, dünya genelinde her dört kişiden birinde görülen bir hastalıktır ve birçok nedeni bulunmaktadır (1). Ayrıca, hepatoselüler karsinomun başlı-

ca nedenlerinden biri olup, önümüzdeki yıllarda karaciğer nakli için en yaygın endikasyonlardan biri olması beklenmektedir (9). NAFLD'nin bir alt kategorisi olan CASH'in en yaygın nedenlerinden biri IRI'dir. IRI kullanımı sırasında gelişen yağlı karaciğer hastalığının patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamış olsa da, ana mekanizmanın mitokondriyal hasar olduğu kabul edilmektedir (10). Bağırsak mikrobiyotası, bakteriler, protozoalar, arkeler, mantarlar ve virüslerden oluşan ve birbirleriyle ve insan vücudu ile belirli bir simbiyotik ilişkiye sahip olan çeşitli bir ekosistemi ifade eder. Artık bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığının fizyolojik ve patolojik durumlarında, sindirimde, B vitamini sentezinde, immünomodülasyonda ve anjiyogenez ve sinir fonksiyonunun desteklenmesinde rol oynadığı iyi bir şekilde kabul edilmektedir. Son on yılda yayınlanan çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının kanser, otizm, depresyon, *Clostridium difficile* enfeksiyonu, inftamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu, kolorektal karsinom, obezite, tip 2 diyabet, ateroskleroz, kronik böbrek hastalıkları ve enfeksiyöz ve enfeksiyöz

olmayan kronik karaciğer hastalıkları gibi çeşitli hastalıklar ve durumlarda rolünü ortaya koymuştur (11). Bağırsak mikrobiyotası, birçok bağırsak dışı organla bağlantılı olan sanal bir metabolik organ olarak kabul edilmektedir ve birincil olarak bağırsak-karaciğer aksı ile bağlantılıdır. Bağırsak-karaciğer aksı, kronik hepatit B, kronik hepatit C, alkolik karaciğer hastalığı, NAFLD, NASH, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinom gelişimi gibi birçok kronik karaciğer hastalığının patogeneğinde etkilidir (12,13).

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak bariyer fonksiyonu üzerinde immunomodülasyon ve anti-inflamatuvar özellikleri aracılığıyla bağırsak-karaciğer aksı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Patogeneşte disbiyozisin etkili olduğu karaciğer hastalıklarının tedavisinde, mikrobiyotayı desteklemek için çeşitli yöntemler tartışılmıştır, ancak hiçbirisi yeterli kanıt seviyesine ulaşmamıştır (14). Fare modellerinde, probiyotiklerin tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve insülin direnciyle ilişkili oksidatif ve inflamatuvar karaciğer hasarını c-Jun N-terminal kinaz ve nükleer faktör-kappa B aracılığıyla olumlu yönde etkilediği ve serum ALT seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (15,16). NAFLD/NASH üzerindeki probiyotiklerin etkilerini araştıran bir meta-analiz, probiyotik tedavilerinin serum aminotransferaz seviyelerini, total kolesterolü, TNF- α 'yı azaltabileceğini ve NAFLD/NASH hastalarında insülin direncini iyileştirebileceğini bildirmiştir (17). Başka bir çalışmada, NAFLD'li hastalarda yüksek ALT ve AST seviyeleri ile karaciğer steatozunun, simbiyotiklerin kullanımı ile önemli ölçüde iyileştirilebileceği gösterilmiştir (18).

IRI kullanımı sonucu gelişen karaciğer hasarı ve probiyotik ilişkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliği taşıyan araştırmamızda, IRI ile birlikte her gün gavaj yolu ile probiyotik takviyesi yapılan grupta serum ALT ve AST seviyelerinin yalnızca IRI uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde düşük

olduğu, karaciğer fonksiyonlarının önemli bir göstergesi olan albümin seviyesinin ise kontrol grubu ile benzer ve yalnız IRI uygulanan gruptan daha yüksek olduğu tespit edildi. Literatürle de desteklenebilecek bu bulgular probiyotiklerin biyokimyasal olarak karaciğer hasarını azalttığını ve fonksiyonları koruduğunu gösterebilmektedir.

Randomize kontrollü bir çalışmada, NAFLD/NASH hastalarında simbiyotik tedavi sonrası yapılan yeni histolojik incelemelerde, NAS skorunun %67 olguda 3 puan veya daha fazla gerilediği ve fibrozis seviyesinin %70'inde iyileştiği gözlemlenmiştir (18). Diğer bir çift kör, randomize, kontrollü çalışmada ise, bir yıl süren probiyotik tedavi sonrası NAFLD/NASH hastalarında NAS skoru, hepatosit balonlaşması ve fibrozis seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı, ancak steatoz ve lobüler inflamasyonla ilgili herhangi bir değişiklik bulunmadığı belirlenmiştir (19). Karaciğer dokusunun histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendiği bu çalışmada, NAS skoru ve bu skoru oluşturan üç parametrenin (hepatosit balonlaşması, lobüler inflamasyon ve steatoz) IRI + probiyotik grubunda, yalnızca IRI alan gruba kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlemlendi.

Sirozda görülen fibrozisin ana bileşeni, stellat hücrelerinden salgılanan kollajendir. Bu hücreler, TNF- α , lenfotoksin, interlökin-1, TGF- β , trombosit kaynaklı büyüme faktörü, lipid peroksidasyon ürünleri ve çeşitli toksinler gibi farklı sitokinlerin etkisiyle miyofibroblast hücrelerine dönüşür (20). Azot monoksit sentezine katılan üç enzimden biri olan iNOS ile karaciğer fibrozisi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, bu enzim genellikle profibrotik bulunmuş, ancak birkaç çalışmada antifibrotik etki göstermiştir. iNOS aktivasyonunun, hipoksiye bağlı faktör-1 ve matris metalloproteinaz-9 gibi çeşitli araçlarla DNA hasarına yol açarak fibrozis gelişiminde rol oynadığı kanıtlanmıştır (21). Literatürde, iNOS'un profibrotik etkisini destekleyen çalışmalarda, iNOS geninin silindiği

veya iNOS aktivitesinin aminoguanidin ile bas-
kalandığı farelerde, kontrol gruplarına kıyasla
karaciğer fibrozis seviyelerinde azalma gözlem-
lenmiştir (22,23). TGF- β , transformasyon büyüme
faktörü ailesine ait bir sitokin olup, apoptoz, yara
iyileşmesi, anjiyogenez, fibrozis, immünomodülas-
yon ve tümör biyolojisi gibi önemli süreçlerde rol
oynar. TGF- β 'nin aşırı üretimi, aşırı kollajen ve
matris birikimine yol açarak organ disfonksiyonu
veya yetmezliğine neden olur. İnflamasyon, iske-
mi, radyasyon ve toksinler, fibrojenizi başlatan
ve akciğerler, kalp, karaciğer, böbrekler ve diğer
organlar ile dokular üzerinde olumsuz etki yarata-
bilen faktörlerdir. Özellikle TGF- β 1 izoformu, ka-
raciğerde fibrozisin ana tetikleyicilerinden biridir.
TGF- β 'nın, miyofibroblastları WNT-5A yolu aracılı-
lığıyla doz bağımlı olarak aktive ettiği ve böylece
fibrozisi tetiklediği gösterilmiştir (24). Ayrıca, in
vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda, TGF- β 'nın
veya tetiklediği yolların inhibe edilmesiyle kara-
ciğerdeki fibrotik aktivitenin azaltılabileceği belir-
lenmiştir (25). Bu veriler ışığında, iNOS ve TGF-
 β 'nın karaciğer fibrozisini artırdığı söylenebilir.
Ayrıca, yalnızca IRI alan grup ile IRI + probiyotik
alan grup arasındaki iNOS ve TGF- β aktiviteleri

arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. IRI + pro-
biyotik alan gruptaki daha düşük aktiviteler ve
aynı gruplar arasında yapılan histolojik inceleme-
lerde hepatosit balonlaşması, steatoz, inflamasyon
ve fibrozis gibi göstergelerdeki iyileşmeler, iNOS
ve TGF- β 'nın profibrotik etkilerini ve probiyotikle-
rin NAFLD/NASH üzerindeki terapötik ve koruyucu
etkilerini desteklemektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, IRI kullanımı
sonucu ortaya çıkan ve morbidite ve mortaliteyi
arttırdığı bilinen yağlı karaciğer hastalığının pro-
biyotik kullanımı gibi düşük maliyetli, kolay tolere
edilebilen bir tedavi ile önlenilebileceğini göster-
miştir. Ancak, bu bulguları doğrulamak için daha
büyük serilerle ve insan katılımcılarıyla yapılacak
ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Etik Kurul: Bu çalışma Kobay DHL A.Ş. yerel
Etik Kurulunun 30.06.2020 tarih ve 497 nolu ka-
rarı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatış-
ması olmadığını beyan ederler.

Finans: Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversite-
si-Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından
finanse edilmiştir (Proje no: 2020/134).

KAYNAKLAR

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiol-
ogy of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assess-
ment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*.
2016;64(1):73-84.
2. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, et al. Chemotherapy regimen
predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality
after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol*.
2006;24(13):2065-72.
3. Vigano L, De Rosa G, Toso C, et al. Reversibility of chemother-
apy-related liver injury. *J Hepatol*. 2017;67(1):84-91.
4. Khalighi A, Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: A Comprehen-
sive Review of Their Classification, Mode of Action and Role
in Human Nutrition [Internet]. Probiotics and Prebiotics in Hu-
man Nutrition and Health. InTech; 2016;19-39. Available from:
http://dx.doi.org/10.5772/63646
5. Italian Association for the Study of the Liver (AISF). AISF posi-
tion paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates
and future directions. *Dig Liver Dis*. 2017;49(5):471-83.
6. Nardone G, Compare D, Liguori E, et al. Protective effects of
Lactobacillus paracasei F19 in a rat model of oxidative and
metabolic hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physi-
ol*. 2010;299(3):G669-76.
7. Costa ML, Lima-Júnior RC, Aragão KS, et al. Chemotherapy-as-
sociated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal
model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(4):711-20.
8. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathol-
ogy. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):3-16.
9. Younossi ZM, Marchesini G, Pinto-Cortez H, Petta S. Epide-
miology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic
Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. *Trans-
plantation*. 2019;103(1):22-7.
10. Zhang X, Fryknäs M, Hernlund E, et al. Induction of mitochon-
drial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in
metabolically compromised microenvironments. *Nat Commun*.
2014;5:3295.

11. Al Khodor S, Shatat IF. Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(6):921-31.
12. Grąt M, Wronka KM, Krasnodebski M, et al. Profile of Gut Microbiota Associated With the Presence of Hepatocellular Cancer in Patients With Liver Cirrhosis. *Transplant Proc.* 2016;48(5):1687-91.
13. Wang J, Wang Y, Zhang X, et al. Gut Microbial Dysbiosis Is Associated with Altered Hepatic Functions and Serum Metabolites in Chronic Hepatitis B Patients. *Front Microbiol.* 2017;8:2222
14. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012;142(7):1592-609.
15. Li Z, Yang S, Lin H, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2003;37(2):343-50.
16. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology.* 2009;49(3):989-97.
17. Ma YY, Li L, Yu CH, et al. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(40):6911-8.
18. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, et al. *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):545-53.
19. Duseja A, Acharya SK, Mehta M, et al. High potency multistrain probiotic improves liver histology in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomised, double-blind, proof of concept study. *BMJ Open Gastroenterol.* 2019;6(1):e000315.
20. The Liver and Bile Ducts. In Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Editors). *Robbins Basic Pathology.* 10th ed. Elsevier - Health Sciences Division; 2017;637-72.
21. Anavi S, Eisenberg-Bord M, Hahn-Obercyger M, et al. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Lab Invest.* 2015;95(8):914-24.
22. Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats. *Liver Int.* 2005;25(3):647-56.
23. Novitskiy G, Potter JJ, Wang L, Mezey E. Influences of reactive oxygen species and nitric oxide on hepatic fibrogenesis. *Liver Int.* 2006;26(10):1248-57.
24. Beljaars L, Daliri S, Dijkhuizen C, et al. WNT-5A regulates TGF- β -related activities in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312(3):G219-G227.
25. Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, et al. Anti-TGF- β strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29(11 Suppl):121S-131S.