

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

**RATLARDA TİYOASETAMİT İLE OLUŞTURULAN
FULMİNAN HEPATİK YETMEZLİKTE RİFAXİMİNİN
BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Yılmaz BİLGİÇ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. M. M. Murat HARPUTLUOĞLU**

MALATYA-2012

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

**RATLARDA TİYOASETAMİT İLE OLUŞTURULAN
FULMİNAN HEPATİK YETMEZLİKTE RİFAXİMİNİN
BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Yılmaz BİLGİÇ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. M. M. Murat HARPUTLUOĞLU**

İÇİNDEKİLER

Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Gereç ve Yöntem	
1. Çalışmanın Hipotezleri	5
2. Araştırmanın Tipi	5
3. Araştırmanın İnsan Gücü	5
4. Hayvanlar	5
5. Fulminan karaciğer yetmezliğinin oluşturulması	5
6. Deneyin tasarımı	6
7. Örneklerin alınması	6
8. Karaciğer histolojisi	6
9. Biyokimyasal analizler	7
a. Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması	7
b. Kan amonyak analizi	7
c. Serum AST, ALT düzeyleri	7
10. Mikrobiyolojik çalışmalar	7
a. Bakteriyel translokasyon	7
b. İntestinal Bakteriyel Overgrowth (İBO)'un değerlendirilmesi	8
11. İstatistik	8
Bulgular	9
1. Karaciğer enzimleri	9
2. İBO ve BT	10
3. Karaciğer histolojisi	12

Tartışma	14
Sonuç ve Öneriler	17
Özet	18
Summary	20
Kaynaklar	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Gruplara göre serum amonyak, AST ve ALT düzeylerinin ortalama \pm SD deęerleri.

Tablo 2. Gruplara göre ileal aspiratta üreyen *Eschericia coli* sayısı ($\times 10^3$ CFU/ml olarak) ve bakteriyel translokasyon sıklığı.

Tablo 3. Gruplara göre karaciğer nekroz ve inflamasyon skorlarının ortalama \pm SD değerleri.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İleal aspirattaki *E.Coli* (10^3 CFU/ml).

Şekil 2. Kontrol grubu (a), TAA grubu (b), TAA+RIF grubu (c), RIF grubu(d)'nda karaciğer histolojisi (Hematoxylin ve eosin X 100).

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FKY:	Fulminan karaciğer yetmezliği
MOYS:	Multiorgan yetmezlik sendromu
BT:	Bakteriyel translokasyon
ROS:	Reaktif oksijen species
İBO:	İntestinal bakteriyel overgrowth
RIF:	Rifaximin
RNS:	Reaktif nitrojen species
TAA:	Tiyoasetamid
TCA:	Trikarboksilik asit
EMB:	Eosin Methylene Blue
CFU:	Colony-forming units
AST:	Aspartat transaminaz
ALT:	Alanin transaminaz

GİRİŞ

Yoğun bakım hastalarında olduğu gibi fulminan karaciğer yetmezliği (FKY)'nde de infeksiyonlar önemli mortalite sebebidir. Bu infeksiyonların patogenezi tam olarak izah edilememiş olmasına rağmen, hastanın kendi barsak florasından kaynaklanan Gram negatif bakteri tranlokasyonu ve bu bakterilerin ürünleri sorumlu tutulmuştur (1). Bir çalışmada sepsis gelişen hastaların %34'ünde herhangi bir septik odak bulunmadığı bildirilmiştir (2). Karaciğer yetmezliğinde intestinal bakteriyel overgrowth (İBO), intestinal hipomotilite ve artmış mukozal permabilite bakteriyel translokasyon (BT) gelişmesinde olası mekanizmalardır (3). Bakteriyel translokasyon barsaktan ekstraintestinal alanlara bakteri ve ürünlerinin pasajı olarak tanımlanmaktadır. FKY'de barsaktan artmış BT mevcuttur (4, 1). Karaciğer hasar modellerinde lactobacillus suplementasyonuna arginin eklenmesi (1), sisaprid (5) ve norflaxacin (6) tedavisiyle BT'nin önlendiği gösterilmiştir.

Rifaximin (RIF), Gram-pozitif ve Gram-negatif aerobik ve anaerobik enterik bakterilere karşı geniş spektrumlu *in vitro* etkinliğe sahip, gastrointestinal lümende konsantre olan ve minimal absorbe edilen oral antimikrobiyal ajandır (7, 8). Rifaximin, hepatik ensefalopati ve ince barsak bakteriyel aşırı çoğalmasında, gastrointestinal sistemde bozulmuş barsak mikroflorasını onarır (9). Tiyoasetamit (TAA) ratlarda FKY modelini oluşturmak için sık kullanılan bir hepatotoksindir (10). Ratlarda, tiyoasetamit ile indüklenmiş FKY'nde İBO ve BT üzerine rifaksiminin etkilerini gösteren çalışma rapor edilmemiştir.

Bu çalışmada Rifaximinin, ratlarda TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde BT üzerine etkileri araştırıldı. BT birçok ciddi klinik tabloda mortalitenin

önemli sebebi olan infeksiyon gelişiminde suçlanmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal özellikleri bulunan bu maddenin BT'ü azalttığıının gösterilmesi klinikte faydalı olabilir.

Çalışmamızın amaçları

1. Rifaximinin TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde İBO ve BT üzerine etkilerini araştırmaktı.
2. İntestinal bakteriyel overgrowth'un BT gelişimindeki rolünü araştırmaktı.

GENEL BİLGİLER

Yoğun bakım hastalarında olduğu gibi fulminan karaciğer yetmezliğinde de infeksiyonlar önemli mortalite sebebidir. Bu infeksiyonların patogenezi tam olarak izah edilememiş olmasına rağmen, hastanın kendi barsak florasından kaynaklanan Gram negatif bakteri tranlokasyonu ve bu bakterilerin ürünleri sorumlu tutulmuştur (1). Bir çalışmada sepsis gelişen hastaların %34'ünde herhangi bir septik odak bulunmadığı bildirilmiştir (2). FKY, masif karaciğer nekrozu ile sonuçlanan dramatik bir klinik sendromdur (11).

Klinik pratikte, kritik yoğun bakım hastalarında bakteriyemi, sepsis veya multiorgan yetmezlik sendromu (MOYS) sıklıkla gözlenmektedir ve bu hastalarda bakteriyemiye yol açacak herhangi bir infeksiyon odağı tespit edilememektedir (12). Normal şartlarda barsak mukozası lümeninde halihazırda bulunan bakteri ve bakteri ürünlerinin barsak dışına kaçışını önleyen lokal defans bariyeri olarak fonksiyon görür. Bu defans mekanizmasını mikrobiyolojik (mikroorganizmalarla temasın önlenmesi ve kolonizasyona direnç), mekanik (mukus tabakası, peristaltizm ve epitelyal bariyer), immunolojik (immünglobulin sekresyonu, lokal makrofaj sistemi) ve barsak-karaciğer aksı (retiküloendotelyal sistem ve safra tuzları) olmak üzere dört faktör oluşturur (13).

Bakteriyel translokasyon, eskiden endojen intestinal bakterilerinin normal intestinal mukozaya doğru invazyonu olarak tanımlanmıştır (14). Günümüzde BT, sadece bakterilerinin mukoza invazyonu değil bununla birlikte bakteri antijen ve endotoksinlerinin intestinal lümeden dolaşıma geçerek uzak organ hasarı ve sistemik inflamasyona sebep olması olarak tanımlanır (15).

Fulminant karaciğer yetmezliği gibi kritik hastalıklarda ortak özellik intestinal hipoperfüzyondur. İntestinal hipoperfüzyon barsakta reaktif oksijen spesiyesleri (ROS)'nin üretimini artırmaktadır. Artan ROS nitrik oksit üretimini artırmakta, direkt

lipid peroksidasyonuna ve barsak duvarında lökosit infiltrasyonuna yol açan proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. Tüm bu etkiler barsakta hasar oluşturarak intestinal bariyer disfonksiyonuna neden olmaktadır (12, 16, 17).

Tiyoasetamid ratlarda FKY modelini oluşturmak için sık kullanılan bir hepatotoksindir (10). TAA ROS artışı ve bunun sonucunda gelişen direkt membran lipitlerinin peroksidasyonu ile doku hasarına neden olur (18, 19).

Rifaximin, emilmeyen bir antibiyotik olup enteropatojenlere karşı aktivitesi vardır ve enfeksiyöz diareler için yararlıdır (20). Rifaximin'in, kısa barsak sendromuna bağlı İBO'nda kullanıldığını gösteren birçok çalışma vardır. Rifaximin, 1,2- 1,6 gr/gün dozunda kullanıldığında kısa barsak sendromuna bağlı İBO'da glukoz hidrojen nefes testi ile hastaların %58 ve %80'inde İBO'yu düzelttiği gösterilmiştir (21). Rifaximin, kısa barsak sendromunda İBO rekürrensini tedavisinde de kullanılmaktadır (22). Rifaximin ve lactilol ile yapılan çok merkezli, randomize ve kontrollü bir çok çalışma sonucuna göre rifaximin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kronik hepatik ensefalopati tedavisinde onaylanmıştır (23).

Şimdiye kadar, TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde Rifaximin'in BT üzerine etkileriyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın amacı Rifaximinin TAA ile oluşturulmuş karaciğer yetmezlik modelinde BT ve İBO etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Çalışmanın Hipotezleri:

1. Ratlarda fulminan karaciğer yetmezlik modelinde antimikrobiyal etkileri olan Rifaximinin İBO ve BT üzerindeki etkileri
2. BT gelişiminde İBO'un rolünün araştırılması.

2. Araştırmanın Tipi:

Araştırma ratlarda yapılan deneysel bir çalışmadır.

3. Araştırmanın İnsan Gücü:

Bu çalışmanın deney aşamasında İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. M. M. Murat Harputluoğlu ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Ramazan Dertli, biyokimyasal incelemelerde Şule Gürsoy ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. İsmail Temel, histolojik incelemelerde Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. N. Engin Aydın, mikrobiyolojik incelemelerde Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Barış Otlı görev almıştır.

4. Hayvanlar

Çalışmada 250-300 gram ağırlığında sağlıklı erkek Wistar ratlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saatlik aydınlık/karanlık sikluslar ve 24 ± 1 °C'de sabit ısısı olan ortamda, su ve rat yemine ulaşabilecekleri kafeslerde barındırıldı. Çalışma protokolü hayvan araştırmaları kılavuzlarına uygundu ve hastanemiz etik kurulu tarafından onaylandı.

5. Fulminan karaciğer yetmezliğinin oluşturulması

Fulminan karaciğer yetmezliği daha önce tanımlandığı gibi 3 gün boyunca 350 mg/kg/gün intraperitoneal tiyoasetamid (Merck, Germany) verilerek oluşturuldu (24). Kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğinden kaçınmak için 20 mEq/l potasyum içeren %0.9 NaCl ve %5 dekstrozu solüsyonu 25 ml/kg dozunda 6 saat arayla destekleyici tedavi olarak subkütan verildi (24).

6. Deneyin tasarımı

Toplam 28 erkek Wistar rat 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (n=7) kontrol grubuydu. Bu gruba 5 gün boyunca intraperitoneal 0.1 ml/gün % 0.9 NaCl verildi. Grup 2 (n=7) TAA grubuydu. Bu gruptaki ratlara 24 saatlik periyodlarla 3 gün boyunca intraperitoneal 350 mg/kg TAA verildi. Grup 3(n=7) TAA+RIF grubuydu. Bu gruba ilk TAA dozuyla aynı gün 50 mg/kg/gün RIF (Drogsan İlaç Şirketi'nden 200 mg, Colidur tablet, Türkiye) ekstraktı sulandırılarak oral başlandı ve 3 gün devam edildi. RIF dozu ve süresi RIF ile ilgili daha önce yapılan çalışmalara göre belirlendi (15, 10). Grup 4 (n=7) RIF grubuydu. Bu gruba sadece oral 50 mg/kg/gün dozunda 3 gün RIF verildi.

7. Örneklerin alınması

Çalışmanın 4. gününde 50 mg/kg Ketamin (Ketolar, Parke-Davis) ve Xylazine HCl (10 mg/kg; Alfazyne %2 Alfasan, Netherland) ile anestezi yapıldı. Deri traş edilip ve iodyene ile temizlendikten sonra sıkı steril şartlar altında laparotomi yapıldı. Abdomen genişçe açıldı. İleoçekal bölge mezenter lenf nodları ve dalak aseptik olarak disseke edildi, alındı, tartıldı ve bakteriyel kültür için steril saline konuldu. Karaciğer aseptik olarak disseke edildi ve sol lob bakteriyel kültürler için kullanıldı. Karaciğer sağ lobu histopatolojik ve biyokimyasal ölçümler için eksize edildi. İntestinal bakteriyel aşırı çoğalmayı değerlendirmek için steril enjektörle 0.1 ml ileal sıvı aspire edildi ve uygun vasatlara ekim yapıldı. Amonyak, aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT) ölçümleri için sağ ventrikülden kan alındı.

8. Karaciğer histolojisi

Karaciğerin histopatolojik incelemeleri için sağ loblarının yarısı ışık mikroskopunda değerlendirilmek üzere işlendi. Bu işlem için alınan sağ loblar %5

nötral formol solüsyonunda fikse edildi. Parafin içine gömüldü, 5 µm kalınlığında dilimlendi ve hematoksilin-eosin ile boyandı. Doku preparatları örneklerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen iki deneyimli patolog tarafından incelendi ve skorlandı. Nekroz ve inflamasyonun derecesi her preparatın 10 farklı alanındaki bulguların 0-3 (0:normal, 1:hafif, 2:orta, 3: şiddetli) arası sınıflandırılmış bir skala ile değerlendirilip ortalamaları olarak ifade edildi (25).

9. Biyokimyasal analizler

a. Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması

Her rattan yaklaşık 4 ml kan alındı. Her kan örneğinin 1 ml'si direkt deproteinizasyon işlemi amacıyla 1 ml %10 trikarboksilik asit (TCA) içeren santrifüj tüplerine nakledildi ve karıştırma işleminin takiben 10 dakika 3000 devirde santrifüje edildi. Daha sonra tüpün üstündeki temiz süpernatant amonyak analizi için kullanıldı. Geriye kalan 3 ml kan örnekleri daha önce işaretlemiş boş santrifüj tüplerine serumlarının ayrılması için nakledildi. Bu örnekler oda ısısında yarım saat bekletildi ve 10 dakika 3000 devirde santrifüje edildi. Bu yolla elde edilen serum örnekleri biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere analiz gününe kadar -20 °C'de depolandı.

b. Kan amonyak analizi

Kan amonyak düzeyleri kolorimetrik Berthelot (indophenol) reaksiyonu (26) kullanılarak ölçüldü. Bu reaksiyonda örneklerdeki daha önce deproteinize edilen serbest amonyak içinde fenol ve hipoklorid iyonlarla alkali ortamda nitroprusside ile reaksiyona girerek mavi renkli indofenol molekülü oluşturur. Kromojenin spektrofotometrede 625 nm dalgaboyunda koyu renkli örneklere karşı ölçülen absorbanansı direkt olarak amonyağın konsantrasyonu ile orantılı olarak artar. Deneyin sonuçları içinde standart şekilde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılan µg amonyak nitrojen/dl olarak ifade edildi.

c. Serum AST, ALT düzeyleri

Serum AST ve ALT düzeyleri International Federation of Clinical Chemistry tarafından tanımlanan ve piridoksal fosfat ve NADH'ın kofaktör olarak kullanıldığı kinetik UV metodu kullanılarak ölçüldü. Her iki analiz için Turgut Özal Tıp Merkezi'nin rutin Biyokimya Laboratuvarlarında kullanılan Olympus auto-analyzer ve aynı firmanın ticari kitleri kullanıldı. AST ve ALT düzeyleri Ünite/L olarak ifade edildi

10. Mikrobiyolojik çalışmalar

a. Bakteriyel translokasyon

Bakteriyel translokasyon mezenterik lenf nodları, karaciğer ya da dalak kültürlerinden herhangi birinde pozitiflik olarak tanımlandı. Her gruptan 1 gr örnek (karaciğer, dalak, mezenterik lenf nodları) 1 ml steril normal salinde homojenize edildi. 100 µl aspire edildi ve Kanlı agar, Eosin Methylene Blue (EMB) agar ve Sabouraud agar'a ekildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Takib eden gün bakteriyel çoğalma kontrol edildi ve koloni sayımı yapıldı. Her koloni için gram boyama yapıldı. Gram boyama sonuçlarına göre katalaz, oksidaz, koagülaz, indol, sitrat indirgenme, üreaz, üçlü şeker demir agarda şeker fermentasyonu gibi spesifik biyokimyasal testler primer olarak izole edilen bakterilerin tanımlanması için uygulandı. Api 20 E test (bio-Merieux, Marcy L'Etoile, France) bakteri tanımlanmasının doğrulanması için kullanıldı.

b. İntestinal Bakteriyel Overgrowth (İBO)'un değerlendirilmesi

Spesifik bir organizmanın İBO'u, normal rat ileal aspiratındaki aynı organizmanın üreyen sayısının ortalaması + 2 standart sapmanın üstündeki değerler olarak tanımlanmaktadır. İleum aspiratının 0.1 ml'si Kanlı agar, EMB agar, Sabouraud agara ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Takib eden gün bakteriyel çoğalma kontrol edildi ve koloni sayımı yapıldı. İleal aspirat koloni sayısı $\times 10^3$ colony-forming units (CFU)/ml olarak belirtildi (27).

11. İstatistik

Sonuçlar ortalama \pm Standart Deviasyon olarak ifade edildi. Analizler SPSS 11,0 istatistik programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki kantitatif değişkenlerin karşılaştırılması one-way ANOVA veya gerektiğinde onun karşılığı olan nonparametrik (Kruskal-Wallis) testi ile yapıldı. Post-hoc karşılaştırma LSD test ile yapıldı. Oran karşılaştırmaları χ^2 veya Fisher test kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalarda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

1. Karaciğer enzimleri

Grupların serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıydı (sırasıyla $p < 0.001$, < 0.001 ve < 0.001) (Tablo 1). TAA grubundaki serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla $p = 0.023$, 0.002 ve < 0.004). TAA grubundaki serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri RIF grubundan anlamlı şekilde yüksekti (sırasıyla $p = 0.002$, 0.002 ve 0.003). TAA+RIF grubundaki serum amonyak, AST ve ALT düzeyleri TAA grubundan anlamlı şekilde düşüktü (sırasıyla $p = 0.004$, 0.046 ve 0.016). .

Tablo 1. Gruplara göre serum amonyak, AST ve ALT düzeylerinin ortalama \pm SD deęerleri.

Grup	AST (Ünite/l) ¹	ALT (Ünite/l) ¹	Amonyak ²
Kontrol (n = 7)	136.33 \pm 16.86	55.67 \pm 6.21	87.5 \pm 6.89
TAA (n = 7)	9980.86 \pm 5559.95 *	6336.5 \pm 1863.14 *	107.14 \pm 19.97 **
TAA+ RIF (n = 7)	4995.17 \pm 1982.55 ***	3811.0 \pm 1229.4***	80.83 \pm 7.36 ***
RIF (n = 7)	100.14 \pm 18.38	66.29 \pm 14.42	62.86 \pm 11.12

¹AST ve ALT Ünite/l olarak belirtildi.

²Amonyak μ g amonyak nitrojen/dl olarak belirtildi.

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P < 0.01$

** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $P < 0.05$

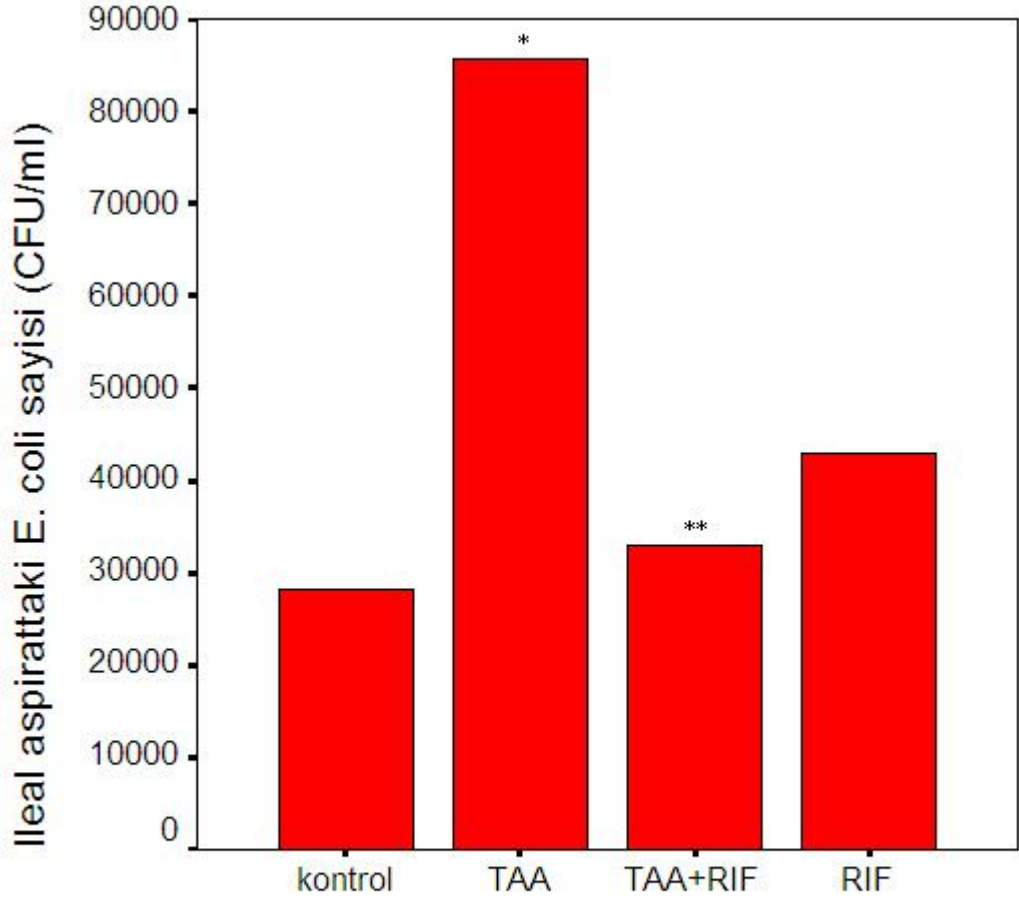
*** TAA grubuyla karşılaştırıldığında $P < 0.05$

2. İBO ve BT

İleal aspirattaki üreyen *E.coli* sayısı TAA grubunda kontrolden yüksekti ($p=0.004$) (Tablo 2). İleal aspirattaki üreyen *E.coli* sayısı TAA+RIF grubunda TAA grubundan düşüktü ($p=0.009$) (Tablo 2) (Şekil 1)

İki grup arasında χ^2 testi ile yapılan karşılaştırmada TAA grubunda BT sıklığı kontrolden anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.005$). TAA ve TAA+RIF grubu arasında BT sıklığında fark yoktu. Tüm gruplarda dalak, karaciğer ve mezenter lenf nodlarında transloke olan bakterinin *E. coli* olduğu görüldü.

Şekil 1. İleal aspirattaki *E.coli* (10^3 CFU/ml)



* Kontrol grubuna göre $P < 0.01$

** TAA grubuna göre $P < 0.01$

Tablo 2. Gruplara göre ileal aspiratta üreyen *Eschericia coli* sayısı ($\times 10^3$ CFU/ml olarak) ve bakteriyel translokasyon sıklığı.

Grup	<i>Eschericia coli</i> sayısı	BT sıklığı (%)
Kontrol ($n = 7$)	28.28 ± 21.34	0 (0%)
TAA ($n = 7$)	$85.71 \pm 24.39^*$	5 (71.4%) *
TAA+ RIF ($n = 7$)	$32.85 \pm 32.51^{**}$	5 (71.4%)
RIF ($n = 7$)	28.33 ± 24.83	0 (0%)

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P < 0.01$

** TAA grubuyla karşılaştırıldığında $P < 0.01$

3. Karaciğer histolojisi

TAA grubunda karaciğer nekroz ve inflamasyon skorları kontrolden anlamlı şekilde yükseldi ($p < 0.001$ ve < 0.001) (Tablo 3). TAA ve TAA+RIF grubu karşılaştırıldığında karaciğer nekroz ve inflamasyon skorları arasında fark yoktu ($p = 0.15$ ve 0.11) (Şekil 2).

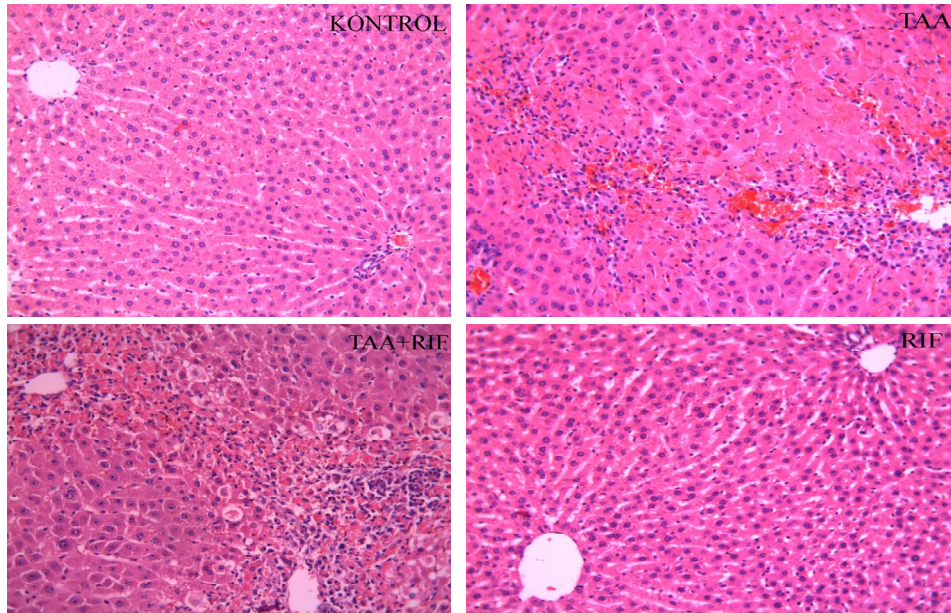
Tablo 3. Gruplara göre karaciğer nekroz ve inflamasyon skorlarının ortalama \pm SD değerleri.

Grup	Nekroz	Inflamasyon
Kontrol ($n = 7$)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TAA ($n = 7$)	$2.71 \pm 0.48^*$	$2.86 \pm 0.37^*$
TAA+ RIF ($n = 7$)	2.43 ± 0.53	2.57 ± 0.53
RIF ($n = 7$)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

*Kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$,

Şekil 2. Gruplara göre karaciğer histolojisi (Hematoxylin ve eosin X 100).

Histoloji



TARTIŞMA

Çalışmamızda tiyoasetamit verilerek fulminan karaciğer yetmezliği başarıyla oluşturuldu. TAA grubunda ciddi hepatik nekroinflamasyon (Şekil 2), anlamlı karaciğer enzim (AST, ALT) ve amonyak yüksekliği saptandı. Aynı grupta ileal aspiratta *E. Coli* sayısı ve BT sıklığı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek bulundu. TAA grubu ile karşılaştırıldığında Rifaximin tedavisi (oral 50 mg/kg üç gün) ileal aspiratta *E.coli* sayısını anlamlı şekilde azalttı. TAA+RIF grubunda belirgin bir karaciğer enzim düşüklüğü saptandı. Ancak rifaximin tedavisi yüksek BT sıklıklarını azaltmadı.

Sağlıklı kişilerde normalde barsak kökenli bakteriyemi ve sepsis görülmez. Çünkü konak, barsakta bakteri ve ürünlerinin barsak dışı dokulara yayılmasını önlemek için birçok defans mekanizması geliştirmektedir. Normal koşullar altında intestinal mukoza intestinal lümendeki bakteri ve bakteri ürünlerinin lümen dışına çıkmasını önlemek üzere lokal defans bariyeri olarak fonksiyon görmektedir. Ancak bazı deneysel ve klinik durumlarda bu intestinal bariyer fonksiyonu bozulur ve sonuçta bakteri ve bakteri ürünleri mezenterik lenf nodları ve sistemik dokulara geçer. Bu süreç bakteriyel translokasyon olarak tanımlanır (13). Yanık, cerrahi stres, sepsis ve multiorgan yetmezlik gibi ciddi klinik tablolarda normal intestinal bariyer fonksiyonunun bozulduğu ve bakterilerin barsaktan barsak dışı bölgelere geçtiği bildirilmiştir (13, 16, 17). İntestinal bariyer fonksiyonunun bozulmasında mukozal hipoksi, oksidatif stres, mukozal asidoz, ATP azalması, nitrik oksit ve sitokinler suçlanmaktadır (28).

Bir rifampisin türevi olan rifaximin, rifampisinle aynı etkinliğe sahip, barsaktan verilen dozun % 0.007'si emilen, güvenli ve yüksek etkili bir antibiyotiktir (29). Vlachogiannakos ve ark. alkolik dekompanse siroz hastalarında rifaximin tedavisinin plazma endotoksin düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını göstermişlerdir (30). Fiorucci ve ark. rifaximin tedavisinin kolit modelinde iyileşmeyi İBO'u ve BT' u azaltarak sağladığını göstermişlerdir (31). Akut pankreatit modelinde de rifaximin enema ile kolon temizliği yapılmasının BT'u azalttığı bildirilmiştir (32). Bu çalışmaların aksine bizim çalışmamızda tiyoasetamitle uyarılmış fulminant karaciğer yetmezliği modelinde rifaximin tedavisi yüksek BT sıklıklarını azaltmamıştır. Ciddi klinik durumlarda, bakteriyel translokasyonu arttıran ana faktörler azalmış immün sistem koruması ve intestinal mukozal bariyerde artmış geçirgenliktir (intestinal mikrovaskülaritedeki değişiklikler veya direkt zedelenmeye sekonder) (3, 32). İntestinal bakteriyel aşırı çoğalma BT ile ilgili önemli bir faktördür. Karaciğer hastalıklarında intestinal bakteriyel aşırı çoğalmanın sebebi dismotilite, antibiyotik kullanımı ve barsakta safra bulunmamasıdır (3). Bu çalışmada rifaximin İBO'yu anlamlı şekilde azaltmış ancak BT sıklıklarını azaltamamıştır. Bu sonuç tiyoasetamite bağlı olabilir. Tiyoasetamit farelerde hepatotoksisiteyi oluşturmak amacıyla çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Harputluoglu M ve ark., aynı doz ve sürede TAA (350 mg/kg üç gün) kullanarak ortaya çıkarılan oksidatif stresin intestinal mukoza bariyerini bozarak BT oluşmasında önemli rol oynadığını bildirmişlerdir (33). Buna ilave olarak Ortega ve ark. TAA'in fare barsağına direkt toksik etkisiyle barsak yapısında ciddi değişikliklere sebep olduğunu bildirmiştir (34). Bu çalışmada barsak histolojisi ve oksidatif stresle ilgili bir ölçüm yapmadık ancak yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda tiyoasetamitin karaciğer yetmezliği oluşturarak ve direkt intestinal toksisiteye neden olarak intestinal bariyer disfonksiyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, bizim bulgularımıza göre barsak bakteriyel yükün azaltılması BT'u engelleyememiştir ve bu modelde BT'un oluşumunda intestinal bariyer disfonksiyonunun önemli rolü vardır.

Bu çalışmadaki bir diğer önemli bulgu da, rifaximin tedavisiyle serum karaciğer enzim düzeyleri ve amonyak düzeylerinde düşüş görülmesidir. Rifaximinin, portal sistemik ensefalopatinin engellenmesi ve tedavisinde etkili olduğu klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Rifaximinin, nitrojenli bileşiklerin yıkımında görevli olan intestinal bakterileri ortadan kaldırarak, amonyak oluşumunu azalttığı düşünülmektedir (35, 36).

Bizim çalışmamızdaki düşük amonyak düzeylerinin rifaximin tedavisine bağlı olarak azalmış intestinal bakteriyel yük ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz. Literatürde rifaximinin karaciğer enzim düzeylerini azalttığı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada portal sistem ya da sistemik dolaşımdaki endotoksin düzeylerini ölçmedik ancak gastrointestinal sistemden olan endotoksineminin, hepatotoksisite açısından önemli bir faktör olduğu iyi bilinmektedir (37). TAA+RIF grubunda, belirgin düşük karaciğer enzim düzeylerinin düşük intestinal bakteriyel yük ile ilişkili olduğu görülmüştür. Son zamanlarda yayınlanan çalışmaların büyük bir kısmı, karaciğer hasarının oluşmasında Kupffer hücrelerinin endotoksinler tarafından aktive edilmesinin önemli rol oynadığını göstermiştir (38). Bu nedenle bizim çalışmamızda karaciğer enzimlerinin düşük olmasının sebebi, azalmış barsak kaynaklı endotoksinin karaciğere ekstra bir hasar vermemesi olabilir.

Sonuç olarak bu modelde, rifaximin tedavisi intestinal bakteriyel yükü anlamlı bir şekilde azaltırken BT'ü engelleyememiştir. Bizim sonuçlarımıza göre, tiyoasetamitle uyarılmış fulminant karaciğer yetmezliği modelinde, İBO'dan çok intestinal bariyer disfonksiyonu ve bozulmuş immün koruma BT üzerinde önemli rol oynamaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. TAA verilmesiyle FKY başarıyla oluşturuldu.
2. TAA verilmesiyle oluşturulan FKY'ne karaciğerde şiddetli hasarın eşlik ettiği gözlemlendi.
3. TAA verilmesi İBO ve BT sıklığını artırdı.
4. TAA verilen grupta artmış BT sıklığına intestinal oksidatif hasar ve İBO'nun eşlik etmesi bu iki faktörün BT gelişiminde önemli rol oynadığını bildiren daha önceki çalışmaları desteklemektedir.
5. Rifaximin tedavisiyle serum karaciğer enzim düzeyleri ve amonyak düzeylerinde düşüş görülmüştür.
6. TAA+RIF grubunda, belirgin düşük karaciğer enzim düzeylerinin düşük intestinal bakteriyel yük ile ilişkili olduğu görülmüştür.
7. Rifaximin tedavisi intestinal bakteriyel yükü anlamlı bir şekilde azaltırken BT'ü engelleyememiştir.
8. Bizim sonuçlarımıza göre, tiyoasetamitle uyarılmış fulminant karaciğer yetmezliği modelinde, İBO'dan çok intestinal bariyer disfonksiyonu ve bozulmuş immün koruma BT üzerinde önemli rol oynamaktadır.

ÖZET

RATLARDA TİYOASETAMİT İLE OLUŞTURULAN FULMİNAN HEPATİK YETMEZLİKTE RİFAXİMİNİN BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Amaç: İntestinal bakteriyel overgrowth (İBO) ve artmış mukozal permabilite karaciğer yetmezliğinde, bakteriyel translokasyon (BT)'u artırdığı ileri sürülen mekanizmalardır. Rifaksimin hepatik ensefalopati ve ince barsak bakteriyel aşırı çoğalması gibi gastrointestinal hastalıklarda barak mikroflorasını restore eden minimal absorpsiyonlu oral bir antimikrobiyal ajandır. Biz ratlarda tiyoasetamit (TAA) ile oluşturulan fulminan karaciğer yetmezliği (FKY)'nde Rifaximinin bakteriyel translokasyon üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Toplam 28 rat 4 gruba ayrıldı. Grup1 (n=7) kontrol grubuydu. Grup 2 (n=7) TAA grubuydu ve bu grupatki ratlar 3 gün boyunca intraperitoneal (ip) olarak 350 mg/k/gün TAA aldı. Grup 3 (n=7; TAA+rifaximin(RIF) ilk TAA dozuyla aynı gün 50 mg/kg/gün RIF ekstraktı sulandırılarak oral başlandı ve 3 gün devam edildi. Grup 4 (n=7; RIF grubu), ratlara sadece oral 50 mg/kg/gün dozunda 3 gün RIF verildi. Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TAA grubunda ciddi hepatik hasar, ileal aspiratlarda artmış *Escherichia coli* sayıları ve yüksek BT sıklıkları gözlemlendi. İliyal aspiratta üreyen *E.coli* sayıları TAA+RIF grubunda TAA grubundan anlamlı olarak düşüktü (p:0.009). TAA+RIF grubuyla TAA grubu arasında BT sıklığı açısından fark yoktu.

Sonuç: Sonuçlarımız TAA ile indüklenmiş fulminan karaciğer yetmezlik modelinde, bakteriyel aşırı çoğalmadan daha çok intestinal bariyer disfonksiyonu ve konakçı immun yanıt bozukluğunun BT gelişmesinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Rifaximin, bakteriyel translokasyon, karaciğer yetmezliği, tiyoasetamit.

SUMMARY

THE EFFECTS OF RIFAXIMIN ON BACTERIAL TRANSLOCATION IN THIOACETAMIDE-INDUCED FULMINANT HEPATIC FAILURE IN RATS.

Abstract

Background and study aims: Intestinal bacterial overgrowth (IBO) and increased mucosal permeability are mechanisms suggested to increase bacterial translocation (BT) in liver failure. Rifaximin (RIF) is a minimally absorbed oral antimicrobial agent which restores gut microflora imbalance in gastrointestinal diseases such as hepatic encephalopathy and small intestine bacterial overgrowth. The aim of the present study was to investigate the effects of rifaximin on BT frequency in thioacetamide (TAA)-induced fulminant hepatic failure (FHF) in rats. Methods: Group 1 (n = 7) was the control group. In group 2 (n = 7), TAA group, rats received 350 mg/kg intraperitoneal TAA daily for three days. In group 3 (n = 7), the TAA + RIF group, rifaximin was began orally at 50 mg/kg daily same day with the first dose of TAA and was maintained for 3 consecutive days. Group 4 (n = 7) was the RIF group, rats received only rifaximin for 3 days (50 mg/kg orally). Results: When compared with the control group, serious hepatic damage, increased *Escherichia coli* counts in ileal aspirates and high BT frequencies were observed in the TAA group. Counts of *E. coli* grown in ileal aspirate

were significantly lower in the TAA+RIF group than in TAA group ($P = 0.009$). There was no difference in BT frequency between the TAA and TAA+RIF groups. Conclusion: Our results suggest that main factors such as intestinal barrier dysfunction and impaired host immune shield apart from IBO plays an important role on BT in TAA-induced FHF model.

Key words: Rifaximin, bacterial translocation, thioacetamide, liver failure.

KAYNAKLAR

1. Adawi D, Kasravi FB, Molin G, et al. Effect of Lactobacillus supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatology* 1997; 25: 642-7.
2. Goris JA, Boekhorst TPA, Nuytinck JKS, et al. Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Ann Surg* 1985; 120: 1109-15.
3. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-71.
4. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990; 30: S184-9.
5. Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 858-63.
6. Llovet JM, Bartolí R, Planas R, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996; 23: 781-7.
7. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 2010; 362: 1071-81.
8. Debbia EA, Maioli E, Roveta S, et al. Effects of rifaximin on bacterial virulence mechanisms at supra- and sub-inhibitory concentrations. *J Chemother* 2008; 20: 186-94.
9. Ojetti V, Lauritano EC, Barbaro F, et al. Rifaximin pharmacology and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5: 675-682.
10. Chen CT, Chu CJ, Wang TF, et al. 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.
11. Schiodt FV, Lee WM. Fulminant liver disease. *Clin Liver Dis* 2003;7: 331-49.
12. De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: Effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005;33: 1125-35.
13. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *Burn Care Rehabil* 2005;26: 383-91.
14. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.
15. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-7.

16. LeVoyer T, Cioffi WG Jr, Pratt L, Shippee R, McManus WF, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg* 1992; 127: 26-9.
17. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20: 411-7.
18. 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.
19. 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.
20. Gadewer S, Fasano A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management acute infectious diarrhea. *Cur Open Farmacol* 2005; 5: 559-65.
21. Scarpellini E, Gabrielli M, Lauritano CE et al. High dose rifaximin for the treatment of the small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 782-6.
22. Scarpellini E, Gabrielli M, Lauritano CE et al. Small intestinal bacterial overgrowth recurrence after antibiotic therapy. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2031-5.
23. Mas A, Rodes J, Sunyer L, et al. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of the acute encephalopathy: Result of the randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 2003; 38: 51-8.
24. Bruck R, Aeed H, Avni Y, et al. 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.
25. Bruck R, Aeed H, Shirin H, et al. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatology* 1999; 31: 27-38.
26. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
27. Guarner C, Runyon BA, Young S, et al. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26: 1372-78.
28. Ranow JS, Fink MP. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Brit Anest* 1996; 77: 71-81.
29. Gillis JC, Brogden RN. Rifaximin. A review of this antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria. *Drugs* 1995; 49: 467-84.
30. Vlachogiannakos J, Saveriadias AS, Viazis N, et al. Intestinal decontamination improves liver haemodynamics in patients with alcohol-related decompensated cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 992-99 (accessed 7 February 2009).
31. Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, et al. Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 2002; 66: 246-256.
32. Marotta F, Geng TC, Wu CC, et al. Bacterial translocation in the course of acute pancreatitis: beneficial role of nonabsorbable antibiotics and lactitol enemas. *Digestion* 1996; 57: 446-52.

33. Harputluoglu MM, Demirel U, Karadag N, et al. The effects of Gingko biloba, vitamin E and melatonin on bacterial translocation in thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *Acta Gastroenterol Belg* 2006; 69: 268-75.
34. Ortega MA, Torres MI, Fernández MI, et al. Hepatotoxic agent thioacetamide induces biochemical and histological alterations in rat small intestine. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1715-23.
35. Koo HL, DuPont HL. Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 17-25.
36. Zieve L. Amino acids in liver failure. *Gastroenterology* 1979; 76: 219–21.
37. Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 167-77.
38. Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-65.